

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. E. Weihe
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung Molekulare Neurowissenschaften: Prof. Dr. med. E. Weihe

Auswirkung von O₃/O₂-Gasgemisch im Peritoneum auf Zytokinproduktion und Schmerzinduktion



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität vorgelegt von

Volker Christian Springmann
aus Horb am Neckar – Nordstetten

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14.01.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: PD Dr. Michael Bette

1. Korreferent: Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

2. Korreferent: Prof. Dr. Leopold Eberhard

Für Brigitte und Bruno

I. Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Ozon – eine Charakteristik	1
1.1.1 Entdeckung des Ozons.....	1
1.1.2 Die Bedeutung des Ozons für die Umwelt	2
1.1.3 Wirkung von Ozon auf den Organismus	2
1.1.4 Antiseptische Wirkung	3
1.1.5 Schädigende Wirkung.....	4
1.1.6 Benefizielle Wirkung: Therapeutische Anwendung von Ozon in der Medizin	4
1.1.7 Wirkung von Ozon auf das Immunsystem	7
1.1.8 Das medizinisch-operative Pneumoperitoneum als mögliche Applikationsart des O ₃ /O ₂ -Gasgemisches.....	8
1.2 Schmerz	9
1.2.1 ISAP-Definition (Internationals Association for the Study of Pain) von Schmerz.....	9
1.2.2 Schmerzempfindung	9
1.2.3 Somatischer Schmerz.....	10
1.2.4 Afferenzen des somatischen Schmerzes.....	10
1.2.5 Viszeraler Schmerz.....	12
1.2.6 Afferenzen des viszeralen Schmerzes.....	14
1.3 Der Writhing-Test als verhaltensbiologische Untersuchungsmethode von viszeralem Schmerz.....	15

1.3.1	c-fos als Marker der neuronalen Aktivität auf spinaler Ebene	15
1.4	Die Entzündungsreaktion als Ausdruck der Aktivierung des Immunsystems.....	16
1.4.1	Proinflammatorische Zytokine.....	16
1.4.2	Nachweis der Immunmodulation und Schmerzinduktion	17
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	18
2.	Material und Methoden.....	19
2.1	Materialliste in alphabetischer Reihenfolge	19
2.2	Versuchstiere	20
2.3	Writhing-Verhaltensversuch	21
2.3.1	Versuchsbox	22
2.3.2	Eingewöhnung der Tiere	22
2.4	Intraperitoneale Injektion	23
2.4.1	Verwendete Reagenzien.....	23
2.4.2	Durchführung	24
2.5	Digitale Videodokumentation.....	25
2.6	Auswertung des Writhing-Tests.....	25
2.7	Gewebeentnahme	27
2.8	Aufarbeiten der Gewebe für die molekularbiologischen Analysen.....	28
2.9	Isolation von RNA aus dem Gewebe.....	28
2.9.1	Verwendete Reagenzien.....	28
2.9.2	Durchführung	28

2.10 RNA-Quantifizierung mit dem Nanodrop-Spektrophotometer	30
2.10.1 Verwendete Reagenzien.....	30
2.10.2 Durchführung	30
2.11 RNA-Quantifizierung mit dem Experion-System	30
2.11.1 Verwendete Reagenzien.....	31
2.11.2 Durchführung	31
2.12 Reverse Transkription	32
2.12.1 Verwendete Reagenzien.....	32
2.12.2 Durchführung	33
2.13 Agarosegel-Elektrophorese.....	34
2.13.1 Verwendete Reagenzien.....	34
2.13.2 Durchführung	34
2.14 Polymerase-Kettenreaktion	35
2.14.1 Verwendete Reagenzien.....	35
2.14.2 Durchführung	35
2.15 Gewinnung von genspezifischen cDNA-Fragmenten.....	36
2.15.1 Verwendete Reagenzien.....	36
2.15.2 Durchführung	37
2.16 Herstellen der Standardkurven für die qPCR	37
2.17 Real-time-quantitative Polymerase-Kettenreaktion	38
2.17.1 Verwendete Reagenzien.....	39
2.17.2 Durchführung	40

2.18 qPCR-Datenanalyse.....	41
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Writhing-Test.....	42
3.2 Schmerzmediatoren auf Rückenmarksebene, gemessen durch c-fos	46
3.2.1 Probenanalyse und Etablierung der qPCR für c-fos- Genexpression.....	46
3.2.2 Expression der c-fos-mRNA im Rückenmark nach dem Writhing-Test.....	49
3.3 Immunstimulation in der Milz, gemessen durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6	53
4. Diskussion	57
4.1 Ozon und Sauerstoff – zwei reaktive Gase	57
4.1.1 Ozon und seine Reaktivität im Gewebe	57
4.1.2 Wirkung von Ozon auf definierte Zellpopulationen.....	59
4.2 Pneumoperitoneum	61
4.3 Wirkung von Ozon im Peritoneum auf die viszerale Schmerzwahrnehmung	62
4.4 Wirkung von Ozon im Peritoneum auf die Zytokinexpression in der Milz.....	65
4.5 Ausblick: Ozontherapie und Schulmedizin – ein no-go?	67
5. Zusammenfassung	69
6. Summary	71
7. Quellennachweis	73

8. Anhang	82
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	82
8.2 Tabellenverzeichnis.....	83
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	84
8.4 Vielfache und Fraktionen.....	85
8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	87
8.6 Danksagung	88

1. Einleitung

1.1 Ozon – Eine Charakteristik

1.1.1 Entdeckung des Ozons

Das Gas Ozon ist keineswegs eine Entdeckung des 20. Jahrhunderts. Es besitzt eine Geschichte, welche sich über mehr als 220 Jahre erstreckt.

Ende des 18. Jahrhunderts beschrieb erstmals der niederländische Chemiker Martin van Marum, dass er bei Funkenentladungen einen eigentümlichen Geruch bemerkt habe, den er der Bildung eines Gases zuschrieb (Marum, 1785). Mehr als 50 Jahre später wurde das Gas durch den deutschen Chemiker Christian Friedrich Schönbein als Produkt bei der Elektrolyse von verdünnter Schwefelsäure wiederentdeckt. Auch ihm fiel der merkwürdige Eigengeruch des Gases auf, worauf er ihm den Namen „Ozon“ (von griech. „ozein“ = duften, stinken, riechen) gab (Schönbein, 1840). Im Jahr 1856 gelang es dem französischen Chemiker André Houzeau das Gas Ozon in der Luft nachzuweisen (Houzeau, 1856). Acht Jahre später ermittelte der Schweizer Jean-Louis Soret für das „Dioxid des Sauerstoffatoms“ die chemische Summenformel „O₃“ (Soret, 1864). Ende des 19. Jahrhunderts zeigte der irische Wissenschaftler Walter Noel Hartley, dass Ozon ein natürlicher Bestandteil der Erdatmosphäre ist, welcher UV-Licht unter 290 nm absorbiert (Hartley, 1881). 1913 gelang es dem französischen Physiker Charles Fabry mittels UV-spektroskopischen Messungen, Ozon in den höheren Schichten der Erdatmosphäre nachzuweisen. Er gilt heute als Entdecker der Ozonschicht (Fabry und Bullson, 1913). Der englische Meteorologe Gordon Miller Bourne Dobson begann 1924 mit der regelmäßigen Messung von Ozon in der Erdatmosphäre mithilfe des von ihm entwickelten Dobson-Spektrophotometers (Dobson, 1924). Er fertigte Aufzeichnungen über die jahreszeitlichen und längengradabhängigen Ausprägungsunterschiede der Ozonschicht an und ermittelte zur Ozon-Quantifizierung die nach ihm benannte Dobson-Einheit (Dobson und

Harrison, 1925). Der britische Astro- und Geophysiker Sydney Chapman postulierte 1930 einen Kreislauf zwischen Sauerstoff und Ozon („Chapman-Cycle“) und zeigte, dass für die Bildung von Ozon aus Sauerstoff ultraviolette Strahlung in Hitze umgewandelt wird, wodurch es zur Erwärmung der Erdatmosphäre kommt. (Chapman, 1930).

1.1.2 Die Bedeutung des Ozons für die Umwelt

Begegnen wir dem Begriff „Ozon“, so assoziieren wir ihn am häufigsten im Kontext mit Luftverschmutzung und dem Ozonloch, einem Rückgang der vor schädlicher Strahlung schützenden Ozonschicht in der Stratosphäre. Seit den 70er-Jahren war die Abnahme der Ozonschicht und vor allem ihre Zerstörung durch Stickoxide ein Forschungsschwerpunkt des niederländischen Meteorologen Paul Josef Crutzen (Crutzen, Isaksen et al., 1975) Aufbauend auf dessen Erkenntnisse und durch weitestführende eigene Forschung in den Jahren 1973 bis 1975 konnten der Chemieingenieur Mario Molina und der Chemiker Sherwood Rowland zeigen, dass die Photodissoziation von Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffen und die damit verbundene Entstehung von Chloratomen zum Abbau von Ozon in der Stratosphäre führt (Molina und Rowland, 1974). Die Entdeckung des Ozonlochs über der Antarktis durch Joseph Farman Mitte der 80er-Jahre brachte die Bedeutung des Ozons für das Leben auf der Erde ins allgemeine Bewusstsein (Farman, Gardiner et al., 1985). 1987 wurde in Montreal im Kontext der Vergrößerung des Ozonlochs eines der wichtigsten globalen Klimaabkommen, das „Montreal-Protokoll“, verabschiedet, durch das sich die 67 teilnehmenden Staaten dazu verpflichteten, den Ausstoß der ozonzerstörenden Chemikalien zu halbieren (U.N.E.P., 2009).

1.1.3 Wirkung von Ozon auf den Organismus

Ozon ist eine metastabile Verbindung, welche nach den Formeln



unter der Bildung von Sauerstoff zerfällt. Bei der Dissoziation von Ozon in wässriger Lösung entstehen Hydroxyl-Radikale (OH-Radikale, „Freie Radikale“) und damit hochreaktive Moleküle, für die fast jedes Biomolekül, insbesondere ungesättigte Fettsäuren, Proteine, Nukleinsäuren und Elektronendonatoren wie Thiole, Ascorbat und α -Tocopherol (Giamalva, Church et al., 1985, 1986a, 1986b, Pryor Houk et al., 2006), ein potenzielles Ziel darstellt. Sie können durch die Bindung an diese Molekülgruppen deren Molekülstruktur verändern (Glaze 1986; Pryor, Houk et al., 2006) und dadurch erhebliche Auswirkungen auf physiologische Abläufe ausüben. Auf den Organismus – vom Bakterium bis hin zum Menschen – wirken diese Radikale ähnlich den in den Mitochondrien jeder Zelle gebildeten ROS (*ROS – reactive oxygen species*). Insbesondere die durch das Ozon gebildeten OH-Radikale versetzen exponierte Gewebe in hohen oxidativen Stress und eben diese Radikale werden für den oxidativen Schaden in Geweben verantwortlich gemacht (Halliwell et al., 1999). Die Wirkung des instabilen O_3 -Moleküls hat direkte Auswirkungen auf den Organismus, die sowohl schädigend, als auch benefiziell sein können.

1.1.4 Antiseptische Wirkung

Das große Oxidationsvermögen von Ozon verleiht ihm eine starke antiseptische Wirkung. Es vermag Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen abzutöten. Diesen nützlichen Effekt machte man sich bei der Aufbereitung von Schmutzwasser in Deutschland erstmals im Wasserwerk Wiesbaden-Schierstein zunutze, welches, 1902 in Betrieb genommen, die Wasserdesinfektion durch Einleitung von Ozongas erreichte (Erlwein, 1902). Im Zuge der Wundversorgung während des Ersten Weltkriegs verwendete man ein O_3/O_2 -Gasgemisch zur antiseptischen Wundbehandlung an britischen Soldaten (Stoker, 1916).

1.1.5 Schädigende Wirkung

Bei der schädigenden Wirkung steht vor allem der Einfluss von Ozon auf die Atmungsorgane im Vordergrund. Die Inhalation schon gering erhöhter Ozonkonzentrationen in der Atemluft kann zu unspezifischer Hyperreaktivität der Atemwege, zu Hyperpermeabilität des respiratorischen Epithels, zu einer Veränderung der mukoziliären Clearance und allgemein zu einer Minderung der körperlichen Leistungsfähigkeit führen (Uysal und Schapira, 2003). Eine amerikanische Kohortenstudie ergab, dass ein über mehrere Jahre erhöhter Ozongehalt in der Atemluft Atmungsorganerkrankungen hervorruft und dadurch signifikante Auswirkungen auf die Sterblichkeit hat (Jerrett, Burnet et al., 2009). Ähnlich wie bei der Inhalation bakterieller Toxine (Lipopolysaccharide) führt die Inhalation von Ozon zu einer Entzündungsreaktion der Atemwege. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ozonexposition, ähnlich einer Endotoxin-induzierten Entzündungsreaktion, die Mucin-Genexpression und die Produktion von Glykoproteinen in Rattenlungen steigert (Wagner, Van Dyken et al., 2003).

1.1.6 Benefizielle Wirkung: Therapeutische Anwendung von Ozon in der Medizin

Seit den ersten erfolgreichen Anwendungen von Ozon als Antiseptikum bei der Wundbehandlung erkannte man neben der Toxizität auch seinen klinischen Nutzen und konnte im Laufe der Jahre weitere therapeutische Effekte festhalten.

Eine klinische Studie zeigte, dass die topische Ozontherapie von Wunden bei der Erkrankung des diabetischen Fußsyndroms (Diabetes mellitus Typ II) im Vergleich zu einer Antibiotikatherapie signifikant schneller zur Reduktion der Wundfläche und schneller zu einer vollständigen Abheilung führt (Martinez-Sanchez, Al-Dalain et al., 2005). Aus derselben Studie geht hervor, dass eine rektale Ozoninsufflation verglichen mit einer Antibiotikatherapie bei

Diabetes mellitus Typ II zu einer signifikant stärkeren Reduktion des Blutglukosespiegels führt.

Weiterhin wird Ozon therapeutisch bei Erkrankungen der Gefäße (Durchblutungsstörungen, Atherosklerose), bei Hepatopathien oder auch in der Regenerationsphase nach durchgemachter schwerer Erkrankung bzw. Operation angewandt. Hier erfolgt die Gabe des Ozons extrakorporal, indem venös entnommenes Vollblut mit einem hyperbaren Ozon-Sauerstoff-Gasgemisch angereichert und anschließend zurück in den Körper injiziert wird. Diese Anwendung wird als Eigenblut-Ozontherapie bezeichnet. Nach Reinfundierung des durch Ozon angereicherten Blutes wird der Organismus angeregt. Hierbei kommt es durch den künstlich induzierten oxidativen Stress zu einer gesteigerten Produktion von Antioxidanzien (Bocci und Di Paolo, 2009).

Bei der minimalinvasiven Behandlung von Patienten mit Bandscheibenprotrusionen infolge degenerativer Bandscheibenerkrankungen durch periradikuläre bzw. periganglionäre Insufflation eines O_3/O_2 -Gasgemisches nutzt man nicht nur die antiinflammatorische Wirkung des Ozons. Durch die Reaktion des Ozons mit den Mukopolysacchariden des Nukleus pulposus kommt es auch zu einer Dehydratation und dadurch zum Schrumpfen der Bandscheibe (Muto, Ambrosanio et al. 2008). Dieser erwünschte Schrumpfungseffekt beeinflusst besonders die Schmerzbelastung der Patienten positiv und macht die O_3/O_2 -Anwendung direkt am Nucleus pulposus zu einer sehr effektiven und, wie sich in Metaanalysen herausstellte, sehr sicheren Anwendung zur Behandlung von Lumbalhernien (Steppan, Meaders et al., 2010).

Tierexperimentelle Studien belegen die therapeutische Potenz einer Ozonbehandlung bei verschiedenen Infektionskrankheiten. In einem etablierten Hamster-Modell führte die Insufflation eines medizinischen O_3/O_2 -Gasgemisches in den Gastrointestinaltrakt zu einer deutlichen Reduktion der durch eine Clindamycin-induzierte Enterokolitis hervorgerufenen Sterberate (Schulz, 1986). Ebenso wurde der Schweregrad des Krankheitsverlaufs bei

einer chronischen Osteomyelitis – einer bakteriell verursachten chronischen Erkrankung des Knochens – durch die lokale Anwendung des O_3/O_2 -Gasgemischs am infizierten Knochen selbst attenuiert (Steinhardt, Schulz et al., 1999). Eine aktuelle Studie im renommierten *Journal of Immunology* zeigte, dass eine Präexposition der Lunge mit inhaliertem Ozon das Organ vor Entzündungen, die normalerweise durch inhaliertes LPS verursacht werden, schützt (Hollingsworth, Maruoka et al., 2007). Vermittelt wurde dieser „*Priming*“-Effekt des Ozons in der Lunge durch eine erhöhte Apoptoserate von Alveolarmakrophagen und Monozyten und einer damit verbundenen Reduktion der in der Lunge infiltrierten Leukozyten.

Anfang der 80er-Jahre wurde festgestellt, dass ein O_3/O_2 -Gasgemisch inhibitorische Wirkung auf humane Karzinomzellen (Lungen-, Mamma- und Urothelkarzinomzellen) in der Kultur besitzt (Sweet, Kao et al. 1980). Diese Beobachtung zeigte eine antitumorigene Wirkung des Ozons zunächst nur in vitro, legte aber die Vermutung nahe, dass sich ein Ozon-Sauerstoff-Gasgemisch möglicherweise auch in vivo zu Therapie von Krebszellen eignen könnte. Erste tierexperimentelle Studien am Urethan-induzierten Lungentumormodell konnten dann in der Tat einen tumorbekämpfenden Effekt von inhaliertem O_3/O_2 -Gasgemisch bei NMRI-Mäusen zeigen (Last, Warren et al., 1987; Schulz, 1989).

Eine aktuelle Studie am aurikulären VX2-Tumor des Kaninchens, einem anerkannten Tiermodell zur Untersuchung der Progression und Metastasierungsrate für menschliche Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) (Mandic, Dünne et al., 2002; Dünne, Mandic et al, 2002; Sapundzhiev, Dünne et al., 2005), bestätigt erneut die antitumorigene Potenz von Ozon. Hierbei führte die Insufflation eines O_3/O_2 -Gasgemisches in die Peritonealhöhle tumor erkrankter Tiere zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums bis hin zur kompletten Remission des Primärtumors und einer Prävention vor üblicherweise auftretenden Metastasen (Schulz, Häussler et al., 2008).

Allerdings lassen die therapeutischen Erfolge in vivo auf Tumore einen direkten, durch Mediatoren (humorale Faktoren wie auch Zellen) getragenen Wirkmechanismus vermuten, da das O_3/O_2 -Gasgemisch nicht am Tumor selbst, sondern systemisch in die Peritonealhöhle appliziert wurde. Eine direkte Wirkung von Ozon auf Zellen des Immunsystems ist bekannt.

1.1.7 Wirkung von Ozon auf das Immunsystem

Der direkte Kontakt von Leukozyten des Blutes mit Ozon führt nicht zu einer Depletion dieser Zellen, sondern weist einen stimulatorischen Effekt auf. Bei der extrakorporalen Ozonisierung von Blutproben konnte eine Anreicherung von proinflammatorischen Zytokinen wie $TNF-\alpha$, GM-CSF, IL-2, sowie $IFN-\gamma$ nachgewiesen werden (Bocci, Borrelli et al., 2009). Ob die intraperitoneale Injektion eines O_3/O_2 -Gasgemisches ebenfalls zu einer gesteigerten Zytokinausschüttung führt, ist derzeit noch offen. Aus Studien an einem Sepsismodell bei Ratten geht hervor, dass die wiederholte intraperitoneale Injektion eines O_3/O_2 -Gasgemisches keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von Zytokinen in lymphatischen Organen und ebenso keinen modulatorischen Effekt auf das T-Zell-abhängige Immunsystem hat (Schulz, Rodriguez et al. 2003). Dennoch wurde eine signifikante Verringerung der Mortalität unter den Versuchstieren beobachtet und daher eine Stimulation des Immunsystems durch Ozon diskutiert.

Ein weiteres Indiz für immunstimulierende Effekte von Ozon könnte die vollständige Remission eines metastasierenden Tumors (VX2) und die dabei erworbene Toleranz gegen den Tumor bei Kaninchen darstellen (Schulz, Häussler et al. 2008). Bei Tieren, die durch die Anwendung von dem Tumor geheilt wurden, zeigt sich nach intraperitonealer Insufflation eines O_3/O_2 -Gasgemisches eine Toleranz, die die Tiere vor einer erneuten Reimplantation des Tumors schützte. Erst nach einer Cyclosporin A und Dexamethason vermittelten Immunsuppression konnte erneut ein VX2-Tumor in den Tieren induziert werden.

Es scheint als wäre Ozon nicht nur ein Stoff, der einem Organismus als Therapeutikum artifiziell zugeführt werden muss, sondern dass Immunzellen von Säugetieren befähigt sind, ozonähnliche Verbindungen zu bilden. Neutrophile Granulozyten generieren unter Katalyse durch Antikörper (IgG) ozonähnliche Verbindungen, welche zur Abtötung von Bakterien dienen (Wentworth, McDunn et al., 2002; Babior, Takeuchi et al., 2003).

1.1.8 Das medizinisch-operative Pneumoperitoneum als mögliche systemische Applikationsart des O₃/O₂-Gasgemisches

Das medizinisch-operative Pneumoperitoneum ist heute als chirurgisches Standardverfahren in der laparoskopischen Chirurgie etabliert. Hierbei kommen Gase wie Stickstoff (N₂) und Stickstoffmonoxyd (N₂O), Helium (He), Argon (Ar) und auch Kohlenstoffdioxid (CO₂) zum Einsatz (Menes und Spivak, 2000). Bei der Verwendung von CO₂ liegt der Schwerpunkt primär auf seiner physikalischen nicht-entzündlichen Eigenschaft. Dies betrifft vor allem operative Eingriffe, bei denen die Möglichkeit einer Elektrokoagulation bestehen muss. Immunologische Analysen zeigten, dass alle verwendeten Gase auch immunmodulatorische Effekte ausüben, die unerwünschte Nebenwirkungen aber auch erwünschte Effekte darstellen können (Jacobi, Wenger et al., 1998). Beispielsweise kommt es unter der Verwendung von CO₂-Gas zu einer Hemmung der intraperitonealen Immunantwort (Chekan, Nataraj et al., 1999). Im Hinblick auf das O₃/O₂-Pneumoperitoneum ist die Wirkung auf das Immunsystem bislang unbekannt. Sie scheint aber – wie oben ausgeführt – therapeutisch nutzbares Potential zu haben. Dabei wird angenommen, dass intraperitoneal insuffliertes O₃/O₂-Gasgemisch eine Art Aktivator für das Immunsystems darstellt, der als neuer, alternativer Ansatz in der Krebstherapie durchaus erfolgversprechend eingesetzt werden könnte (Schulz, Häussler et al., 2008).

Für den Einsatz dieses Gasgemisches als intraperitoneal verabreichtes Therapeutikum ist es aber essenziell, mögliche unerwünschte Effekte zu erfassen. So stellt sich die bislang offene Frage, ob die Insufflation dieses

radikalen Gasgemisches zu einer belastenden Schmerzempfindung führt, die eine analgetische Prämedikation notwendig macht. Hierbei müssen alle Wege der Schmerzwahrnehmung berücksichtigt werden.

1.2 Schmerz

1.2.1 ISAP-Definition (International Association for the Study of Pain) von Schmerz

Schmerz ist international definiert als ein “als unangenehm empfundenes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit und ohne potenzieller oder aktueller Gewebeschädigung auftreten kann...” (Bonica, 1979)

Schmerz signalisiert dem Körper gefährliche und schädigende Situationen und löst zum Schutz Rückzugsreflexe aus. Ist ein Körperteil geschädigt, wird durch Schmerz die reflexartige Schonung, Schonhaltung oder Ruhigstellung des Körperteils erreicht (Hobson und Aziz, 2003)

1.2.2 Schmerzempfindung

Eine Grobe Gliederung der für diese Arbeit relevanten Schmerzarten wird in Abbildung 1 dargestellt.

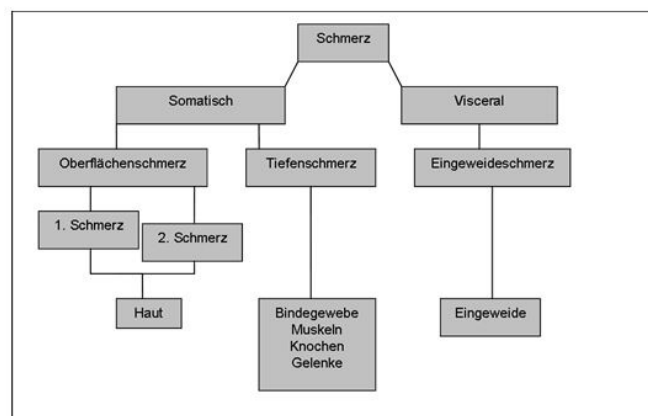


Abbildung 1: Gliederung der Schmerzempfindung

1.2.3 Somatischer Schmerz

Der somatische Schmerz geht von Geweben wie Haut, Muskeln, Bändern, Knochen oder von Gelenken aus und wird auch als muskulo-skelettaler Schmerz bezeichnet. Er wird durch Stimulation spezieller Rezeptoren, wie freie Nervenendigungen von schnellen A- δ - oder langsameren C-Fasern oder durch Dehnung, Entzündung oder Sauerstoffunterversorgung des Gewebes verursacht (Raja, Meyer et al., 1988).

Der somatische Schmerz kann zur näheren Charakterisierung in zwei aufeinanderfolgende Schmerzereignisse unterteilt werden:

Erster Schmerz:

Dieser ist ein oberflächlicher Hautschmerzreiz und wird durch schnelle, dünn myelinisierte A- δ -Fasern geleitet. Er wird als hell, stechend, leicht lokalisierbar und schnell abklingend beschrieben.

Zweiter Schmerz:

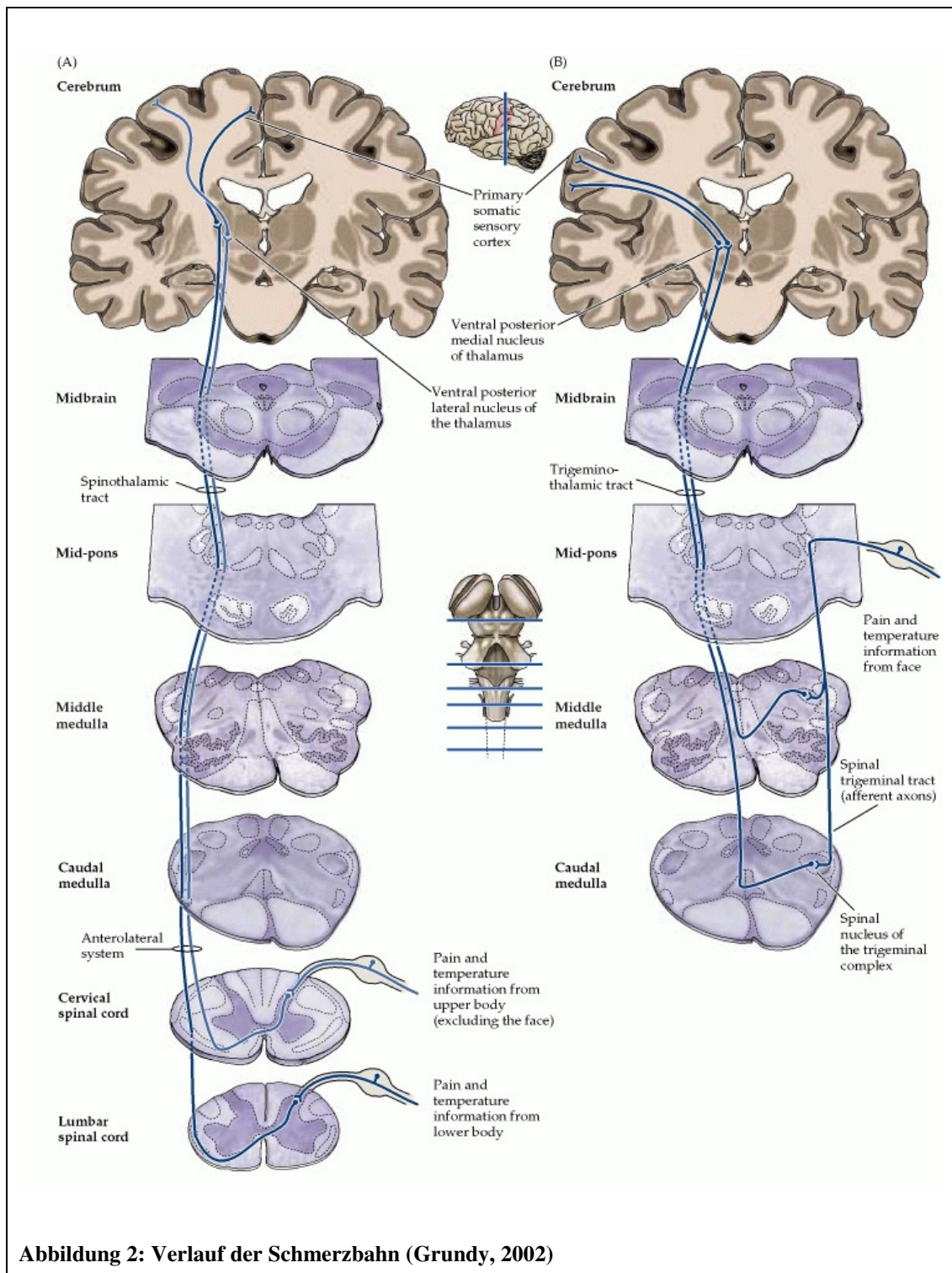
Er folgt dem schnellen, ersten Schmerz in einem zeitlichen Abstand von 0,5-1s. Er entspricht dem Schmerzreiz aus tiefer liegenden Geweben (Muskel, Bänder, Knochen, Gelenke), wird durch langsamere, nicht myelinisierte C-Fasern geleitet und eher als brennend und langanhaltend wahrgenommen (Raja, Meyer et al., 1988).

1.2.4 Afferenzen des somatischen Schmerzes

Der Schmerz wird durch die Stimulation von Nervenendigungen, welche z. T. korpuskulär differenzierte Endstrukturen (Merkel-Zell-Axon-Komplexe, Vater-Pacini-Körperchen, Meissner-Körperchen) aufweisen, durch mechanische oder chemische Reize, extrem hohe oder niedrige Temperaturen, durch Sauerstoffmangel (und der damit assoziierten Ansäuerung des Gewebes) oder durch Gewebeschädigung (und dem dabei freigesetzten ATP und Bradykinin) generiert. Freie Nervenendigungen finden sich in mehreren

Gewebeschichten (Dermis, Faszien, Organkapseln, Sehnen, Adventitia der Blutgefäße, in den Hirnhäuten, Gelenkkapseln, im Periost, Perichondrium, Havers-Kanäle des Knochens, Peritoneum parietale, Wandschichten der Eingeweide und im Endomysium aller Muskeltypen) und in jedem Bindegewebe. Des Weiteren sind sie im Epithel der Haut, Kornea, in der Schleimhaut der Mund- und Wangenhöhle sowie in der Wandung und den Drüsen von Magen-Darm- und Respirationstrakt lokalisiert (Cesare und McNaughton, 1997). Nach dem adäquaten Reiz folgt der erste, stechende, über schnelle, dünn-myelinisierte A- δ -Fasern übertragene Schmerz, während der zweite, eher dumpfe Schmerz über langsamere, nicht myelinisierte C-Fasern übertragen wird. Die Zellkörper beider Nervenfasern liegen in den Spinalganglien und treten im Bereich des Tractus posterolateralis (Lissauer-Zone) in das Hinterhorn des Rückenmarks ein. In der unmittelbar ventral der Lissauer-Zone gelegenen Region der Substantia gelatinosa enden die A- δ -Fasern hauptsächlich in den Laminae I und V und werden durch eine glutamaterge Synapse auf ein zweites Neuron verschaltet (Calvino und Grillo, 2006; Gray, 1858).

Die Stränge der zweiten Neurone der schnellen A- δ -Fasern kreuzen auf der Höhe ihres Eintritts in das Rückenmark in der Commissura alba auf die kontralaterale Seite und ziehen im Tractus spinothalamicus lateralis an der ventralen Seite des Rückenmarks zum Zwischenhirn. Hier treten die Fasern in den Thalamus (hauptsächlich in den Nucleus ventralis posterolateralis (VPL) ein und werden auf ein drittes Neuron verschaltet. Die Fasern ziehen weiter zum somatosensiblen Großhirnkortex und hier vor allem in die somatosensorischen Rindenfelder S I und S II, wo die lokalisatorische Schmerzwahrnehmung erfolgt (Cesare und McNaughton, 1997; Basbaum, 1999; Gray, 2005; Hunt und Hervé, 2005; Calvino und Grilo, 2006). Der Verlauf der Schmerzbahn wird in Abbildung 2 dargestellt.



1.2.5 Viszeraler Schmerz

Der viszerale Schmerz kann durch fünf wichtige klinische Charaktereigenschaften beschrieben werden (Cervero und Laird, 1999):

1. Er wird nicht von allen inneren Organen verursacht: Leber-, Nieren- oder das Lungenparenchym sind nicht schmerzempfindlich.
2. Er ist nicht immer mit einer Verletzung bzw. Erkrankung der Leibeshöhle oder der Eingeweide assoziiert: Beispielsweise kommt es bei starker Dehnung der Harnblase zu einem Schmerzereignis, welches ohne Verletzung verursacht wird.
3. Es handelt sich um einen diffusen, schlecht lokalisierbaren Schmerz.
4. Er kann sich an verschiedenen Körperstellen bemerkbar machen (Übertragener Schmerz).
5. Er ist vergesellschaftet mit motorischen und autonomen Reflexen wie Übelkeit, Erbrechen, Rückenschmerzen und Muskelkrämpfen.

Kontraktion oder Spasmen, aber auch Dehnung der glatten Muskulatur von Hohlorganen, Zug oder Distorsion der Mesenterien, Ischämie, chemische Reizung der Mukosa sowie akute Entzündungsreaktionen können zu akutem viszeralem Schmerz führen. Bei Schnittverletzungen oder thermischer Schädigung hingegen kommt es nicht zu einem akuten viszeralem Schmerzereignis.

Die meisten Thorax- und Abdominalorgane (außer das Pankreas) werden durch sympathische und parasympathische Fasern innerviert. Vor allem die oberen Abdominaleingeweide (Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon ascendens und Colon transversum) werden parasympathisch durch den N. vagus, den X. Hirnnerv, innerviert. Ab einem Areal im Bereich der linken Kolonflexur (Cannon-Böhm-Punkt) erfolgt die Eingeweideinnervation hauptsächlich durch Fasern aus dem thorakolumbalen und sakralen Rückenmark (Nn. splanchnici). Entlang der vorrangig beschriebenen Fasertypen ziehen spinale und vagale Afferenzen zum Rückenmark. Hierbei übernehmen hauptsächlich die spinalen Afferenzen die Schmerzübertragung, während vagale Afferenzen nichtschmerzhafte Informationen wie Hunger, Sättigungsgefühle und Übelkeit ans ZNS senden (Sengupta, 2009).

1.2.6 Afferenzen des viszeralen Schmerzes

Nervenzellen, welche viszerale Schmerz detektieren, können an ihrer peripheren Endigung – ähnlich wie bei sensorischen Afferenzen – freie Nervenendigungen, aber auch verschiedene spezialisierte Gebilde wie Vater-Pacini- oder Lamellenkörperchen aufweisen und reagieren vor allem auf mechanische, chemische und thermische Stimuli (Sengupta, 2009). Die Lokalisation und der Verlauf der primären Afferenzen wird in Abbildung 3 dargestellt.

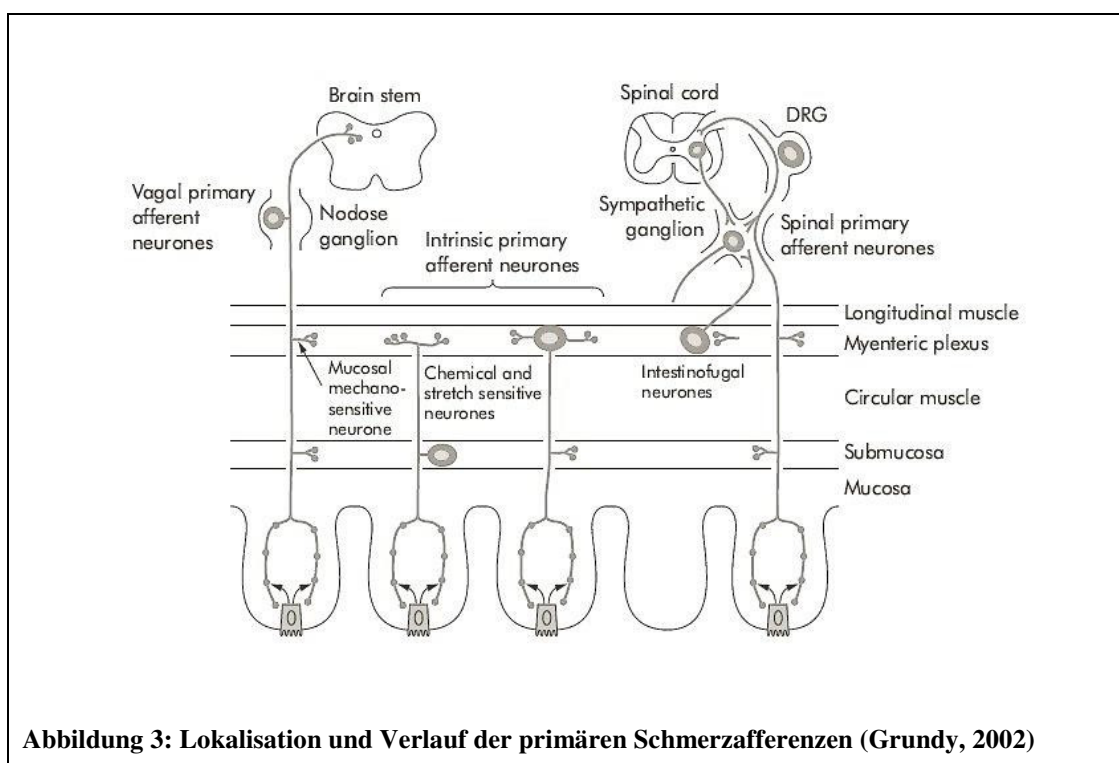


Abbildung 3: Lokalisation und Verlauf der primären Schmerzafferenzen (Grundy, 2002)

Die Zellkörper der ersten Neurone liegen im Bereich der Spinalganglien (Purves, Augustine et al., 2001; Gray, 1858). Sie treten im Bereich des Hinterhorns in das Rückenmark ein und projizieren sich hauptsächlich auf Lamina I und Lamina II sowie Lamina VIII – X (Grundy, 2002). Hier kommt es zu einer Konvergenz von viszerosensiblen und somatosensiblen Afferenzen, wodurch es zum Phänomen des übertragenen Schmerzes mit Schmerzmanifestation in Head'schen Zonen kommen kann (Hunt et al., 2005).

1.3 Der Writhing-Test als verhaltensbiologische Untersuchungsmethode von viszeralem Schmerz

„to writhe“ – engl. „sich krümmen“, „winden“

Der Writhing-Test ist ein Modell zur Untersuchung akuter viszeraler Schmerzen am Säugetier. Er ist leicht zu reproduzieren und als Verhaltensversuch etabliert (Le Bars et al., 2001). Intraperitoneale Injektionen von Chemikalien wie Essigsäure verursachen bei Versuchstieren Abdominalspasmen und äußern sich sichtbar in Krümmungsbewegungen der Tiere im Rumpfbereich (Siegmund et al., 1957; Eckhardt et al., 1958). Writhing-Aktionen sind typischerweise im Mausmodell eine Kombination von Flachpressen des Abdomens auf den Boden, Wellen von Kontraktionen der Rectus-abdominis-Muskulatur, gefolgt von einer Dorsalflexion des Rückens (teilweise kombiniert mit einem Neigen des Rumpfes nach links oder rechts) und einer Extension der Hinterbeine.

1.3.1 c-fos als Marker der neuronalen Aktivität auf spinaler Ebene

Um das Auftreten einer Schmerzbelastung bei der intraperitonealen Injektion bzw. Insufflation verschiedener Chemikalien zu detektieren und die Stärke der bei der Schmerzweiterleitung in Neuronen des Rückenmarks entstehenden neuronalen Aktivität zu quantifizieren, kann das c-fos-Gen als Marker herangezogen werden. Das c-fos-Gen gehört zur Familie der früh exprimierten Protoonkogene. Im Tiermodell hat sich das Protoonkogen c-fos als Markerprotein auf Rückenmarksebene etabliert, das schnell und direkt auf nozizeptiven Input in Neuronen im Hinterhorn induziert wird (Coggeshall, 2005) und dessen Expressionsspiegel mit Art, Intensität und Zeitdauer eines Schmerzstimulus korreliert (Hossaini, Duraku et al., 2010). Die genauen Aufgaben des Gens und seines Produkts innerhalb der Zellphysiologie sind Gegenstand aktueller Forschung (Hoffman und Lyo, 2002).

1.4 Die Entzündungsreaktion als Ausdruck der Aktivierung des Immunsystems

Als Entzündungsreaktion versteht man die Abwehr einer lokalen Schädigung des Gewebes durch Erreger (Bakterien, Viren), Trauma (Gewebsverletzung) oder durch andere schädigende Prozesse (thermisch, chemisch, Strahlung). Der Körper versucht durch eine gesteigerte Immunantwort und erhöhte Abwehrbereitschaft ein potentiell schädliches Agens zu zerstören und die normale Funktion und Integrität des Organismus wieder herzustellen. Durch das Einbringen eines fremden Agens (Essigsäurelösung, Gase) in das Peritoneum könnte der Körper dementsprechend mit einer Entzündungsreaktion antworten. Zur Analyse einer Entzündungsreaktion eignet sich die Bestimmung bekannter löslicher Mediatoren, die diese zu Beginn der Reaktion fördern. Bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen spielen neben zytogenen (biogene Amine, Eikosanoide) und serogenen Mediatoren (Kallikrein – Kinin, Complement) proinflammatorische Zytokine wie Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine und Tumor-Nekrose-Faktoren eine wichtige Rolle (Egger, 2005).

1.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Zytokine werden hauptsächlich von Zellen der weißen Zellreihe und von praktisch allen kernhaltigen Zellen eines Organismus gebildet. Es lassen sich lokale, auto- und parakrine Wirkungen in der Körperperipherie (Wachstumsstimulation bzw. –inhibierung, pro- und auch anti-inflammatorische Effekte) von endokrin (nach zentral) vermittelten Wirkungen (Veränderung der Körpertemperatur, Auswirkungen auf den Gemütszustand und Appetit) unterscheiden (Corwin et al., 2000). Auch die Teilung und Proliferation immunkompetenter Zellen wird durch Zytokine stimuliert (Amiot, 1997). Zu einer Steigerung der Zytokinausschüttung kommt es im gesunden Organismus während Wachstumsvorgängen, aber auch im Rahmen von Abwehrreaktionen bei Infektionen durch Mikroorganismen, Verletzungen,

Entzündungsreaktionen und bei psychischer Belastung (Dinarello, 1999; Gabay et al., 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die beiden Interleukine 1 beta (IL-1 β) und 6 (IL-6) näher betrachtet.

IL-1 tritt in zwei Isoformen auf (IL-1 α und IL-1 β), wobei IL-1 β als Auslöser der meisten biologischen Effekte gilt (Watkins und Maier, 1999). IL-1 β wird von zahlreichen Zellen als Antwort auf Gewebeschädigung oder Infektion sezerniert. Es führt zur Steigerung der Zytotoxizität von Makrophagen und natürlichen Killerzellen, regt B-Zellen zur Proliferation und zur Differenzierung in Plasmazellen an und rekrutiert Granulozyten ins Entzündungsgebiet (Suffredini, Fantuzzi et al., 1999). IL-1 β und vor allem IL-6 stimulieren während der Immunantwort die Produktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber.

IL-6 wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen gebildet. Es handelt sich um einen pyrogenen Mediator, der zusammen mit anderen Zytokinen die Erhöhung der Körpertemperatur vermittelt. Es aktiviert die Differenzierung von B- und T-Zellen sowie die Immunglobulinproduktion (Gabay et al., 1999; Borghetti, 2009). Durch einen negativen Feedback-Mechanismus inhibiert IL-6 die IL-1-Produktion und hat dadurch einen regulatorischen Effekt auf den Ablauf von Immunreaktionen (Fenton, 1992).

1.4.2 Nachweis der Immunmodulation und Schmerzinduktion

Um mögliche immunmodulatorische Eigenschaften eines intraperitoneal applizierten O₃/O₂-Gasgemisches zu analysieren, kann die Veränderung der Genexpression der zuvor genannten proinflammatorischen Zytokine und Proteine in lymphatischen Geweben (Milz) von Versuchstieren auf molekularer Ebene untersucht werden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie sich am Tiermodell gezeigt hat, besitzt eine intraperitoneale Insufflation eines O_3/O_2 -Gasgemisches therapeutische Wirkung auf Entzündungen und bei Tumorerkrankungen. Diese Beobachtung weckt die Hoffnung, dass diese Anwendung auch bei anderen Tierspezies oder später auch beim Menschen als erfolgreicher, neuer therapeutischer Ansatz dienen könnte. Eine Etablierung von neuen Therapiemodellen beinhaltet natürlich auch den Nachweis der Unbedenklichkeit und der Verträglichkeit sowie die Analyse möglicher Nebenwirkungen. Da eine intraperitoneale Insufflation eines radikalen O_3/O_2 -Gasgemisches in den Bauchraum durchaus mit Schmerzen verbunden sein könnte, ist das Ziel dieser Arbeit, den Schmerzaspekt dieser Insufflationstherapie zu untersuchen. Vom Ergebnis werden grundlegende Erkenntnisse der Schmerzbelastung im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung der intraperitonealen (O_3/O_2)-Insufflationstherapie am Tier und später ggf. auch am Menschen erhofft.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Sammlung von Anhaltspunkten über den Mechanismus der Ozonwirkung. Der vermutete modulatorische Effekt auf das Immunsystem wird anhand der Genexpression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-1 β ,) im sekundär lymphatischen Gewebe der Milz charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste in alphabetischer Reihenfolge

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Kobe, Fabrik für Labor- und Krankenhausbedarf (Marburg, D)
Automatisches Elektrophoresesystem	„Experion“ BioRad (München, D)
Cryo-Röhrchen	„Nunc CryoTube“, Nalge Nunc (Roskilde, DK)
DEPC-Water-Cleaning-Chip	„Experion“ BioRad (München, D)
DNA-Aufreinigungssäulen	„NucleoSpin Extract II Columns“, Macherey-Nagel (Düren, D)
Einmalkanülen	„BD Microlance 3“, Becton Dickinson (NJ, USA)
Einmalpipetten 3mL	Greiner BIO-ONE (Frickhausen, D)
Einmalspritzen	„Norm-Ject“, Henke (Tuttlingen, D)
Elektrophorese-Chip	„Experion RNA StdSens“ BioRad (München, D)
Elektroden-Cleaning-Chip	„Experion“, BioRad (München, D)
Priming-Station	„Experion“, BioRad (München, D)
Vortex-Station	„Experion“, BioRad (München, D)
Futter für Versuchstiere	Rod-16-H-Alleinfutter, Las vendi (Soest, D)
Geldokumentationsanlage	„Gel Doc 1000“, Bio-Rad (München, D)
Homogenisator	„Precellys 24“, Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux, FR)
Reinigungstücher, flusenfrei	„Kimwipe“, Kimberley-Clark (Mainz, D)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Magnetrührstäbe	„Bola“, Bohlender (Grünsfeld, D)
Magnetrühr-Wärmeplatten	„RH basic“, IKA Labortechnik (Staufen, D)
Mikrowelle	„intellrowave“ LG electronics (Willich, D)
Ozongenerator	„Medozon compact“, Herrmann (Kleinwallstadt, D)
PC	„Supersonic 1000“, Gericom (Linz, D)
PCR-System	„Geneamp 9700“, Applied Biosystems (Darmstadt, D)
PCR-Tubes und Caps	8-Strip 2µL, Lightlabs (Dallas, USA)
pH-Meter	„766“, Knick (Berlin, D)
Pipettenspitzen, gestopft 10µL, 100µL, 1000µL	„Biosphere“ Sarstedt (Nümbrecht, D)
Plattformschüttler	„Polymax 1040“ MJ Research (New York, USA)

Präzisionswaage	„Scaltec SBL 33“, Denver Instrument (Göttingen, D)
Real-Time-PCR-Platten	„96-Well TW-MT-Platte“ Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Real-Time-PCR System	„ABI-prism 7900 HT“ Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Reaktionsgefäße (Cups)	Eppendorf (Hamburg, D)
Reinstwasseranlage	„Milli-Q“, Millipore (Billerica, USA)
Reprofotographieanlage	„Reprovit Ilc“, Esselte-Leitz (Stuttgart, D)
Software (Statistik)	„Graph-Prism 4“ GraphPad Software (San Diego, USA)
Software (Webcam)	WebCam Companion 2.0.15.51, ArcSoft (CA)
Spektrophotometer	„NanoDrop ND-1000“, Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Sterilbank	„Uniflow 1800“ UniEquip (Martinsried, D)
Sterilfilter	„Millex-GS 0,22µm“, Millipore (Bedford, USA)
Temperaturmessfühler	„ETS-D4 fuzzy“ IKA Labortechnik (Staufen, D)
TRIS-Chromatographie-Säulen	„Micro Bio-Spin P-30“ BioRad (Hercules, CA)
Universal-Kleinschüttler	„Vortex Genie 2“, Bender & Hihenheim AG (Zürich, CH)
Voltmeter	„BioMax MBP 300“ Kodak (Stuttgart, D)
Waage	„1012 MP“, Sartorius (Göttingen, D)
Wärmeschrank	„Thermo“, Heraeus (Hanau, D)
Webcam	2,3 Megapixel, ArcSoft (Fremont, CA)
Zentrifuge für 96-Well-Platten	Multifuge 3 L-R Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge	„Labofuge 400R“ Heraeus (Hanau, D)

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche und weibliche Mäuse des Stammes C57/BL6 (Charles River, Sulzfeld, D) im Alter zwischen sechs und acht Wochen mit einem Körpergewicht von 20 g - 30 g verwendet. Im hauseigenen Tierstall wurden die Tiere in einem 12 h / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Es stand ihnen zu jeder Zeit Futter, Wasser und Nistmaterial (Zellstoff, Papprollen) zur Verfügung. Der Tierversuch wurde

vom Regierungspräsidium Gießen geprüft und genehmigt (Az: V 54 – 19 c 20 – 15 (I) MR 20/11- Nr. 47/2008).

2.3 Writhing-Verhaltensversuch

Der Writhing-Verhaltensversuch (Writhing-Test) stellt eine akzeptierte verhaltensbiologische Messmethode zur Detektion und sogar zur Quantifizierung von abdominalen Schmerzreaktionen am Mausmodell dar (Le Bars, 2001; Ness, 1999). Während des Writhing-Tests zeigen Versuchstiere nach intraperitonealer Gabe eines schmerzauslösenden Agens ein charakteristisches Verhalten: bei Abdominalschmerzen kommt es zum Flachpressen des Rumpfes auf den Boden, zu in kurzen Zeitabständen wiederholten Krümmungen der Wirbelsäule und zu weitem Ausstrecken der Hinterbeine (Ness, 1999). Diese typischen Krümmungsbewegungen (writhing) gaben dem Verhaltensversuch seinen Namen. Die auftretenden Krümmungen (Writhing-Aktionen) wurden durch den Untersucher innerhalb eines Zeitraumes von jeweils 10 min gezählt. Anhand der Anzahl der Writhing-Aktionen pro Zeiteinheit können Rückschlüsse über die Stärke und die Dauer der Schmerzbelastung gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend dem publizierten Modell (Mogil, Wilson et al., 1999) als schmerzauslösendes Agens eine 7 %-ige Essigsäurelösung in isotoner PBS-Lösung in einem Volumen von 200 µl in den Bauchraum injiziert. Die Essigsäurelösung wurde als Positivkontrolle mit den zwei in der Arbeit verwendeten Gasen (O₂ bzw. O₃/O₂-Gasgemisch) auf deren schmerzauslösende Wirkung bei intraperitonealer Insufflation in einem Volumen von 1 ml verglichen.

2.3.1 Versuchsbox

Für den Writhing-Test Für den Writhing-Test wurde eine Versuchsbox (Abbildung 4) aus durchsichtigem Plexiglas (Höhe 30 cm, Breite 40 cm, Tiefe 29,5 cm) verwendet, die mit dem üblichen Streu, das auch in den Haltungskäfigen verwendet wurde, ausgelegt war. Die Box wurde durch eine undurchsichtige Milchplexiglasscheibe in zwei Kammern (Breite 19 cm, Tiefe 28 cm, Höhe 30 cm) getrennt, sodass für die zwei parallel im Versuch befindlichen Tiere kein Sichtkontakt bestand und so eine Beeinflussung des Testergebnisses durch Empathie zwischen den Tieren vermieden werden konnte (Langford, Cragger et al., 2006).

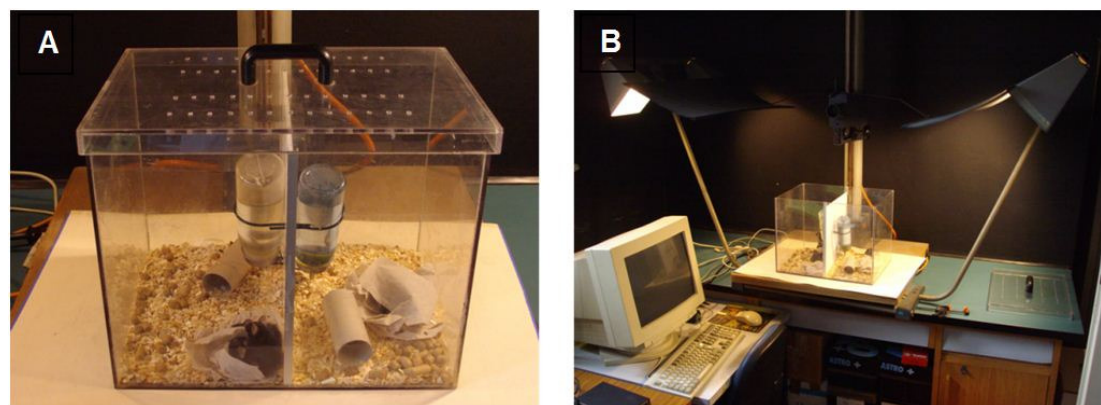


Abbildung 4: Versuchsaufbau für den Writhing-Test

A: Plexiglas-Versuchsbox. B: Für die digitale Videodokumentation wurde die Versuchsbox zur besseren Ausleuchtung auf einer Reprofotografieanlage platziert.

2.3.2 Eingewöhnung der Tiere

Da es sich um einen Verhaltensversuch handelt, wurden die Tiere zur Eingewöhnung an die Umgebung, in der der Versuch stattfinden sollte, für 24 h vor Versuchsbeginn paarweise in die zwei Versuchskammern der Box gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Tiere zueinander gesetzt wurden, die schon im Tierstall zusammen in demselben Käfig gehalten wurden und aneinander gewöhnt waren. Den Tieren stand während der

Eingewöhnungsphase Nahrung, Wasser sowie Nistmaterial (Zellstoff, Papprollen) zur freien Verfügung.

Nach der Eingewöhnungsphase wurde jeweils ein Tier pro Kammer wieder in den angestammten Käfig zurückgesetzt, während das zweite Tier in der Versuchskammer verblieb. Zur besseren Übersichtlichkeit während der Filmaufnahmen wurden für die Dauer des Versuchs die Wasserflaschen sowie die Halterungen demontiert und das Nistmaterial entfernt. Das Futter wurde während des Writhing-Tests belassen.

2.4 Intraperitoneale Injektion

2.4.1 Verwendete Reagenzien

- a) Ozon-Sauerstoff (O_3/O_2)-Gasgemisch mit einem Anteil von 80 μg O_3 pro 1 Liter reinem O_2 (O_2 medizinischer Sauerstoff von Linde D; O_3/O_2 generiert aus dem O_2 mittels eines Hochstrom-Ozongenerators (Medozon compact®, Herrmann Apparatebau GmbH, Kleinwallstadt, D). Das O_3/O_2 -Gasgemisch wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch hergestellt*
- b) Sauerstoff 100 % (Linde, D)*
- c) Essigsäure 0,7 %-ig, pH 2,74 ($H_3C-COOH$; Carl Roth, Karlsruhe, D)*
- d) Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % (NaCl; Diaco Biomedical, I)*

Zur Vermeidung Kontaminationen wurden alle Lösungen durch sterile Millex-Filtereinheiten filtriert. Zur Vermeidung von Enterotoxinen im Wasser wurden alle Lösungen mit Reinstwasser (Firma B. Braun, D), geeignet für die medizinische Injektion, angesetzt

2.4.2 Durchführung

Die Tiere wurden nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema behandelt.

Tabelle 1: Behandlungsschema für den Writhing-Test

Gruppe	Tieranzahl	Behandlung	Volumen	Konzentration	pH-Wert
1	12	O ₃ /O ₂	1,0 ml	80 µg/ml	
2	12	H ₃ C-COOH	200 µl	0,7 % [Millan; 1993]	2,74
3 (Sham 1)	12	NaCl	200 µl	0,90 %	
4 (Sham 2)	12	O ₂	1,0 ml	100 %	

Für die intraperitoneale Injektion der Lösungen bzw. die Insufflation der Gase wurden sterile, latex- und silikonölfreie 1 ml Einmalspritzen und sterile 0,7x30 mm (22G) Einmalkanülen verwendet. Die Injektionsstelle wurde im oberen Unterbauch nahe der Medianlinie gewählt. Zum Erhalt der Gase und dem Abfüllen in 1 ml Einmalspritzen wurde das Röhren- und Schlauchsystem des Ozongenerators (Abbildung 5) mit O₂-Gas geflutet, eine Konzentration von 80 µg O₃ pro ml eingestellt und der Hochstromgenerator im Gerät gestartet.



Abbildung 5: Ozongenerator „Medozon compact“

Hermann Apparatebau, Kleinwallstadt, D

Durch zwei- bis dreimaliges Abziehen des Gases aus dem System mit einer 60 ml-Spritze wurde das im Gerät befindliche Schlauchsystem gespült, sodass sicher eine O_3/O_2 -Gaskonzentration von 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ am Luer-Lock-Anschluss anlag. Hier konnte nun eine 1 ml Spritze angeschlossen und mit dem Gasgemisch gefüllt werden.

Für das Abfüllen des 100 %-igen O_2 in eine 1 ml Spritze wurde derselbe Ozongenerator verwendet. Hierfür wurde im Software-Menü des Geräts eine Ozonkonzentration von 0,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gewählt. Dadurch wurde der Ozongenerator ausgeschaltet, so dass keine Synthese von O_3 erfolgen konnte und ausschließlich reiner Sauerstoff am Luer-Lock-Anschluss entnommen werden konnte.

2.5 Digitale Videodokumentation

Das Filmen der Tiere erfolgte mit einer digitalen Kamera (Webcam) sowie der dazugehörigen Software. Nach der in Tabelle 1 aufgeführten Behandlung erfolgte das Filmen der Tiere für 120 min aus der Vogelperspektive. Die Kamerainstallation erlaubte eine parallele Verhaltensbeobachtung beider im Versuch befindlichen Tiere von oben. Unmittelbar nach der Injektions- bzw. Insufflationsbehandlung wurden die Tiere in die Kammern der Versuchsbbox eingesetzt und die Aufnahme gestartet.

2.6 Auswertung des Writhing-Tests

Die Auswertung der Videoaufzeichnungen der Writhing-Testserien erfolgte nicht verblindet durch den Untersucher. Die Anzahl der Writhing-Aktionen pro 10 min, beginnend unmittelbar nach Applikation der Testsubstanz / des Testgases, wurden ermittelt und zunächst in ein Datenprotokoll (Abbildung 6) eingetragen. Zur statistischen Analyse des Writhing-Tests wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA-Test, Analysis of Variance) durchgeführt. Writhing-Aktionen derselben Zeitpunkte aller 4 Testsubstanzen

2. Material und Methoden

wurden verglichen. Zur weiteren Datenverarbeitung wurde die Statistiksoftware GraphPrism 4.0 verwendet.

Writhing-Test Nr.: 3 Datum: 15.12.08

Versuchstiere: ms ♀

Stamm: C 57 BL 6

Alter: * 30.07.08

Auswertung erfolgte am 17.05.09

BOX 1: Video li. H ₃ C-COOH		BOX 2 Video re. O ₂ O ₃	
Maus 1		Maus 2	
0-10 1	90-100 1	0-10 /	90-100 /
10-20 	100-110 11	10-20 /	100-110 /
20-30 11	110-120 1	20-30 /	110-120
30-40 		30-40 /	
40-50 1		40-50 /	
50-60 		50-60 /	
60-70 		60-70 /	
70-80 		70-80 	
80-90 1		80-90 	

Abbildung 6: Datenprotokoll zur Quantifizierung der Writhing-Aktionen

2.7 Gewebeentnahme

Direkt im Anschluss an die Filmaufnahmen 120 min nach Versuchsbeginn wurden die Tiere durch Inhalation von Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, D) narkotisiert und knapp oberhalb des Schultergürtels dekapitiert. Die in Tabelle 2 aufgeführten Organe wurden direkt entnommen und für verschiedene weiterführende Analysen aufgearbeitet.

Tabelle 2: Schema zur Organpräparation nach dem Writhing-Test

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Hirn	X	X	X	X
Rückenmark (gesamt)	X	X	X	X
Spinalganglion	X	X	X	X
Lymphknoten (mesenterial)	X	X	X	X
Peritoneum	X	X	X	X
Omentum majus	X	X	X	X
Leber	X	X	X	X
Milz	X	X	X	X

Da diese Arbeit auf die Expression von RNAs im Gewebe fokussiert ist, wird im Folgenden nur die methodische Aufarbeitung der Gewebe für die molekularbiologischen Analysen beschrieben.

2.8 Aufarbeiten der Gewebe für die molekularbiologischen Analysen

Unmittelbar nach erfolgter Präparation wurde ein kleines Gewebestück jedes Organs in RNA-Later-Lösung (*Sigma St.Louis, Missouri, USA*) überführt. Diese kommerziell erhältliche Lösung besitzt starke RNase hemmende Wirkung. Um ein schnelles Eindringen der RNA Later Lösung ins Gewebe und damit eine effektive Protektion der RNA vor endogenen RNasen zu erhalten, wurden alle Gewebeproben mit einem Skalpell in kleinstmögliche Stücke zerkleinert und in 400 µl RNA-Later überführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 4,0 °C wurde das RNA-Later abpipettiert und die Gewebe in Cryo-Röhrchen bei -80 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

2.9 Isolation von RNA aus dem Gewebe

2.9.1 Verwendete Reagenzien

- a) *TRIzol (Gibco; USA)*
- b) *Trichlormethan (Chloroform; Karl Roth, Karlsruhe, D)*
- c) *Glykogen (20mg/ml), RNase-frei*
- d) *Isopropanol 100 % (Karl Roth, Karlsruhe, D)*
- e) *Ethanol 75 % (Karl Roth, Karlsruhe, D)*
- f) *Steriles Wasser (H_2O_{steril} ; B. Braun, Melsungen, D)*

2.9.2 Durchführung

Um eine effiziente und standardisierte Isolation der RNA aus Geweben zu erhalten, ist es essenziell, alle Gewebeproben gleichermaßen zu homogenisieren. Hierzu wurde das Homogenisationssystem „Precellys 24 Homogenisator“ der Firma peqlab (Erlangen, D) verwendet. Bei diesem

System werden auch kleinste Gewebestücke mittels Keramikugeln unter starken Vibrationen homogenisiert. Die parallele Homogenisation von 12 Proben garantiert zusätzlich eine hohe Standardisierung der Prozedur.

Von den Gewebeproben wurden maximal 20 mg in jeweils 1 Precellys-Lysegefäß – gefüllt mit Keramikugeln – gegeben und 200 µl TRIzol hinzupipettiert. Die Lysegefäße wurden in der Halterung des Precellys-Gewebehomogenisators installiert und bei 6.000 rpm für 20 sec homogenisiert. Danach wurden in jedes Homogenisator-Röhrchen weitere 800 µl TRIzol hinzugegeben und für 5 sec auf einem Vortexer gemischt. Die hieraus entstandene Lösung wurde in ein neues Cup überführt, 220 µl Trichlorethan hinzupipettiert und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 12.000 rpm für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Es entstand eine dreiphasige Auftrennung, wobei sich in der unteren, organischen Phase das rötliche Gemisch aus Trichlormethan und Phenol befand, in der Interphase eine weißliche Schicht nicht in der organischen Phase gelöster Proteine und in der oberen klaren, wässrigen Phase die RNA. Die wässrige Phase wurde vorsichtig und ohne Kontamination mit Proteinen der Interphase mit der Pipette abgenommen und in ein frisches Cup gegeben. Auf ein Volumen der wässrigen Phase von 250 µl wurden 2,5 µl RNase-freies Glykogen (20 mg/ml) gegeben. Es erfolgte die RNA-Fällung durch Zugabe eines äquivalenten Volumens Isopropanol 100 % bei Raumtemperatur. Danach wurde die Lösung für 15 min bei 12.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das RNA-Pellet mit 500 µl Ethanol 75 % bei -20 °C gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm und 4 °C für 5 min. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei Raumtemperatur für 15-30 min luftgetrocknet. Danach wurde das RNA-Pellet in 50 µl Reinstwasser aufgenommen und Konzentration und Reinheit der isolierten RNA im Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt.

2.10 RNA-Quantifizierung mit dem Nanodrop-Spektrophotometer

2.10.1 Verwendete Reagenzien

- a) zu quantifizierende RNA-Probe
- b) H_2O (Reinstwasser)

2.10.2 Durchführung

Zunächst erfolgte die Reinigung der oberen und unteren optischen Fläche des Nanodrop-Spektrophotometers durch Aufpipettieren von 2 µl Reinstwasser und dem Schließen des Gerätes für 1 min, sodass die obere und die untere optischen Einheiten in das Reinstwasser getaucht wurden. Danach wurden beide optische Einheiten mit einem Kimwipe-Tuch abgewischt. Im Anschluss erfolgten die Initialisierung des Geräts und eine Kalibrierung durch Auftragen von 1,2 µl Reinstwasser als Blank-Probe. Nach jeder Messung wurden die optischen Einheiten mit einem Kimwipe-Tuch gereinigt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben wurde 1,2 µl unverdünnte RNA-Probe verwendet.

Die Proben wurden anschließend durch Zugabe von einer entsprechenden Menge an Reinstwasser auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl oder bei sehr geringen Mengen auf 0,01 µg/µl verdünnt.

2.11 RNA-Quantifizierung mit dem Experion-System

Das Experion-System (BioRad, München, D) ist ein automatisches Elektrophoresesystem zur Analyse von Proteinen und RNA unter Verwendung eines Mikro-Chips, der gleichzeitig 12 Proben auswertet. Es trennt Proteine oder RNA in Konzentrationen im Nanogrammbereich elektrophoretisch auf und analysiert dabei deren Reinheitsgehalt und

Integrität. Mit dem Experion-System werden mehrere Arbeitsschritte (Auftrennung, Detektion der RNA Banden, Größenzuordnung der Banden sowie Messung der Proben in einem Schritt automatisiert zusammengefasst.

2.11.1 Verwendete Reagenzien

- a) *zu quantifizierende RNA-Probe in H₂O Reinstwasser*
- b) *Experion RNA StdSens Kit (BioRad, California, USA):*
 - 1. *GS-Lösung: 65 µl G-Lösung + 1 µl RNA-Stain-Lösung*
 - 2. *RNA-Ladder*
 - 3. *Loading Buffer*
- c) *Experion Electrode-Cleaner (BioRad, München, D)*

2.11.2 Durchführung

Zur Vermeidung von Kontaminationen werden vor Beginn jeder Analyse die Elektroden des Experion-Elektrophoresesystems mittels eines Electroden-Cleaning-Chips gereinigt. Dazu wurde dieser Chip mit 800 µl der speziell dafür vorgesehenen Experion-Electrode-Cleaner Lösung befüllt, auf die Plattform des Experion-Elektrophoresesystems aufgesetzt und die Elektroden für 2 min in die Reinigungsflüssigkeit eingetaucht. Nach 2 min wurde der Electrode-Cleaning-Chip mit einem mit DEPC-Wasser gefüllten Chip ausgetauscht und für 5 min im Gerät belassen, um die Reinigungslösung von den Elektroden zu waschen. Zum Abschluss des Reinigungsvorgangs wurden die Elektroden bei geöffnetem Deckel für einige Minuten bei Raumluft getrocknet.

Zum Vorbereiten des Mikro-Chips wurde zunächst die benötigte Gelmatrix frisch angesetzt, indem 600 µl G-Lösung bei 1.500 xg für 10 min durch einen

Sterilfilter zentrifugiert wurden. Für die Anfärbung der Proben wurde zusätzlich 1 µl RNA-Stain in ein vorgelegtes Volumen von 65 µl der G-Lösung gegeben (GS Lösung). 9 µl der GS-Lösung wurden dann in das auf dem Chip dafür vorgesehene Well pipettiert und die Gelmatrix mittels einer automatischen Priming-Station in den Chip eingepresst.

Zum Beladen des Chips wurden je 5 µl der GS-Lösung, der G-Lösung sowie des Loading-Buffers in die entsprechend beschrifteten Wells des Chips pipettiert. Es folgt das Beladen des Chips mit 1 µl RNA-Ladder sowie 1 µl der jeweiligen Probe. Die RNA-Ladder als auch die Proben wurden unmittelbar vorher für 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Der so beladene Mikro-Chip wird auf einer zum System gehörigen Vortex-Station geschüttelt, um eine gute Durchmischung der Proben zu gewährleisten, und anschließend im Experion-Elektrophoresesystem eingesetzt.

2.12 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription handelt es sich um das Umschreiben von RNA-Sequenzen in komplementäre DNA-Sequenzen, die als copy-DNA (cDNA) bezeichnet werden. Kleine Oligomere (Oligonukleotide), bestehend aus 10 bis 100 Basen, können an RNA-Fragmente binden und dienen als Startpunkt (Primer) für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase).

2.12.1 Verwendete Reagenzien

- a) *zu transkribierende RNA-Probe*
- b) *First strand Buffer: 250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM Kaliumchlorid, 15 mM Magnesiumchlorid; 50 mM DTT (Fermentas, St. Leon-Rot, D)*

- c) *dNTP-Mix: Nukleotid-Mix aus je 10 μM Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytosintriphosphat (dCTP), Desoxyguanintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) (PEQLAB, Erlangen, D)*
- d) *Oligo-DT Primer: Deoxythymine 20 μM in 1:5-Verdünnung (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)*
- e) *DTT 0,1 mM; Dithiothreitol (Life Technologies, Darmstadt, D)*
- f) *RNase-Inhibitor (Ribo-Lock, Fermentas, St. Leon-Rot, D)*
- g) *M-MLV Reverse Transkriptase: Moloney Murine Leukemia Virus (Promega Corporation, Wisconsin, USA)*
- h) *H₂O_{steril} (B. Braun, Melsungen, D)*

2.12.2 Durchführung

Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte mit den in Tabelle 3 aufgeführten Volumina pro Probe.

Tabelle 3: Schema für die Reverse Transkription

Reverse Transkription	Volumen[μl]
RNA-Probe	10
First-Strand Buffer	4
dNTP-Mix	2
Oligo-DT Primer	1
DTT	1
Mit H ₂ O _{steril} auffüllen auf	18
RNase-Inhibitor	1
Reverse Transkriptase	1
V _{gesamt}	20

In der PCR-Maschine („Geneamp 9700“, Applied Biosystems, Darmstadt, D) erfolgte die enzymatische Reaktion bei 37 °C für 60 min Ein

Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min beendet die reverse Transkription und die synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.13 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Durchführung einer erfolgreichen reversen Transkription der RNA-Proben wurden die cDNA-Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

2.13.1 Verwendete Reagenzien

- a) *Agarose 1 % (Merck, Darmstadt, D)*
- b) *1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer): 40 mM Tris-Acetat; 50 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA pH 7,4)*
- c) *Ethidiumbromid 10 µg/µl ($C_{21}H_{20}N_3Br$; Merck, Darmstadt, D)*
- d) *Loading Dye (Merck, Darmstadt, D)*
- e) *DNA-Ladder („Gene Ruler“, Fermentas, Canada, USA)*

2.13.2 Durchführung

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurde 0,5 g Agarose 1 % abgewogen und 50 ml 1x TAE-Puffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig im TAE-Puffer gelöst war. Als Farbstoff für den Nachweis der DNA wurden 50 µl Ethidiumbromid (10 µg/µl) hinzupipettiert. Für den Erstarrungsprozess wurde die Gel-Lösung in ein, mit einem Kamm versehenes, Kasting-Kit gegossen. Nach Entfernen des Kammes wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x

TAE-Puffer übergossen, sodass das Gel leicht vom Laufpuffer überflossen wurde.

In die erste, durch den Kamm präformierte, Elektrophoresetasche wurden als Referenz 10 µl DNA-Ladder pipettiert. In die übrigen Taschen wurden je 10 µl der zu untersuchenden Proben plus Loading Dye pipettiert. Die Elektrophorese wurde unter einer Spannung von 120 mV durchgeführt.

Mit Hilfe der Geldokumentationsanlage „Gel Doc 1000“ (BioRad München, D) erfolgte die Gelanalyse und Ergebnissicherung durch Fotodokumentation.

2.14 Polymerase-Kettenreaktion

2.14.1 Verwendete Reagenzien

- a) H_2O_{steril} (B. Braun, Melsungen, D)
- b) zu amplifizierende cDNA-Proben
- c) Primer-Mix 10 µM
- d) 2x KAPA Fast Ready Mix (PEQLAB, Erlangen, D)

2.14.2 Durchführung

Für jede Primerpaar-spezifische Analyse der cDNA-Proben erfolgte zunächst die Herstellung eines Mastermixes nach dem Pipettierschema in Tabelle 4 (Seite 36). Hier ist das Volumen für den Ansatz einer einzelnen Probe angegeben; bei mehreren Proben wurde das Volumen entsprechend vervielfältigt.

Zu den 23 µl des Mastermix wurden je 2 µl der zu amplifizierenden cDNA-Proben hinzupipettiert, sodass nun für jede Probe ein Gesamtvolumen von 25 µl vorlag. Die PCR-Cups wurden mit einem Deckel verschlossen und im Heizblock der Geneamp 9700 PCR-Maschine (Applied Biosystems,

Darmstadt, D) platziert. Die PCR erfolgte nach folgendem Programm: 25 Zyklen mit 95°C für 3 min 10 sec; 55 °C für 15 sec; 72 °C für 8 min 10 sec. Danach erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Abkühlung der Amplikons auf 6 °C.

Tabelle 4: Ansatz für einen PCR-Mastermix

Komponente	Volumen [µL]
2x KAPA Fast Ready Mix	12,5
Primer Mix c= 10µM	3
H ₂ O _{steril}	7,5
Volumen _{gesamt}	23

2.15 Gewinnung von genspezifischen cDNA-Fragmenten

Um absolut quantitative PCR-Analysen genspezifischer mRNA-Templates in Gewebehomogenisaten vornehmen zu können wurden spezifische cDNA-Fragmente (Primer-Amplikons) nach der Vervielfältigung mittels der PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Agarosegel extrahiert. Nach der Quantifizierung mittels des Nanodrop-Spektrophotometers können diese Templates zur Generierung einer Standardkurve in der realtime-qPCR-Analyse verwendet werden. Dies erlaubt eine absolute Bestimmung der Anzahl von Templates dieser mRNA in einzelnen Gewebeproben.

2.15.1 Verwendete Reagenzien

- a) *DNA-Aufreinigungskit: „Nucleospin extract II“ (Macherey-Nagel, Düren, D)*
- b) *Binding-Buffer NT*

c) *Elution Buffer NE 5 mM Tris/HCl pH 8,5*

d) *Wash-Buffer NT3*

Alle Puffer sind im Aufreinigungskit enthalten

2.15.2 Durchführung

Für die Aufreinigung der Primer-Amplikons wurden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die Agarosestückchen, die die Banden enthielten, mit der Feinwaage gewogen. Die Agarosestückchen wurden in 100 mg - 150 mg große Stücke geschnitten und in Eppendorf-Cups gegeben. Zu einem 100 mg-Gelstück wurden 200 µl Binding-Buffer NT hinzupipettiert und bei 50 °C für 10 min inkubiert. Diese Lösung wurde auf eine DNA-Aufreinigungssäule pipettiert und für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Danach wurden 700 µl Wash-Buffer NT3 hinzupipettiert und erneut für 1 min bei 11.000 xg zentrifugiert. Es folgte ein Trocknungsschritt durch das Abzentrifugieren für 2 min. bei 11.000 xg. Für die Eluierung der DNA wurden 15 µl des auf 70 °C erwärmten Elution-Buffers NE hinzupipettiert und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Abzentrifugation für 1 min bei 11.000 xg in ein Eppendorf Reaktionsgefäß. Die Konzentration der Amplifikationsprodukte nach Aufreinigung wurde durch Messung mit dem Nanodrop®-Spektrophotometer ermittelt.

2.16 Herstellen der Standardkurven für die qPCR

Anhand der Nanodrop-Daten wurde das Molekulargewicht jedes Primer-Amplikons in Dalton ermittelt und die DNA-Molekülanzahl pro µl errechnet. Für die Berechnungen wurde die frei verfügbare Online-Software unter <http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html> verwendet. Anschließend erfolgte ein Normalisierungsschritt der Amplikons auf eine DNA-

Molekülanzahl von $5 \cdot 10^9$ / μl . Ausgehend von diesem Normalisierungsschritt wurde für jedes Primer-Amplikon zwei voneinander unabhängige Verdünnungsreihen (Standard A und B, Tabelle 5) angefertigt.

Tabelle 5: 2 unabhängige Verdünnungsreihen

Standard A					IPK					
Konzentration [n/ μl]	$5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^0$
Amplikon [μl]	10	10+90	9+81	7+63	50+450	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18
Volumenges [μl]		91	83	20	498	20	20	20	20	20
Standard B					IPK					
Konzentration [n/ μl]	$5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^0$
Amplikon [μl]	2	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18	2+18
Volumenges [μl]		18	18	18	18	18	18	18	18	20

Beim Herstellen der Standard mit $5 \cdot 10^5$ Templates wurden die Volumina so gewählt, dass ein größeres Volumen der Konzentration von $5 \cdot 10^5$ / μl als Interplate-Kalibrator (IPK) zur Verfügung stand.

2.17 Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR) ist eine molekularbiologische Technik für den Nachweis und zur Quantifizierung einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz. Sie stellt derzeit die sensitivste Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression dar (Arya, Shergill et al., 2005). Das Prinzip einer quantitativen Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR ist auf das Amplifikationsverfahren durch konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (wie unter 2.14 erläutert) aufgebaut und wurde erstmals 1993 von Higuchi et. al beschrieben (Higuchi, Fockler et al., 1993). Um den Vorgang der Doppelstrangbildung detektieren zu können, wird bei der qPCR ein in den DNA-Doppelstrang interkalierender Fluoreszenzfarbstoff

(SYBRgreen) verwendet, welcher bei der Einlagerung in doppelsträngige DNA blaues Licht emittiert.

2.17.1 Verwendete Reagenzien

- a) *Primerpaare (Tabelle 6): Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), c-fos, Beta-Aktin (β -Akt) (Eurofins mwg operon, Ebersberg, D). Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass sie möglichst Intron-Exon-Grenzen überspannen, damit mögliche Kontamination von chromosomaler DNA anhand der Schmerzkurven der amplifizierten cDNA-Fragmente identifiziert werden können.*
- b) *Power SYBR-Green Master Mix (PEQLAB, Erlangen, D)*
- c) *H₂O_{steril} (B. Braun, Melsungen, D)*
- d) *Carrier RNA 100 ng/ μ l: 50 μ l E. coli tRNA 100 mg/ml in 50 ml DEPC-H₂O (Roche, Basel, CH)*

Tabelle 6: Für die qPCR verwendete Primerpaare

Primer	Sequenz (5' - 3')	Größe [bp]	Start	Stop
IL1- β forward	TGCAGCTGGAGAGTGTGGATCCC	23	658	680
IL1- β reverse	TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG	23	807	785
IL-6 forward	CCTCTCTGCAAGAGACTTCCATCCA	25	40	64
IL-6 reverse	AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT	22	191	170
c-fos forward	CCGCGAACGAGCAGTGACCG	20	39	58
c-fos reverse	GGAAAGCCCGCAAGGGGTC	20	126	107
β -Aktin forward	AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCG	21	29	49
β -Aktin reverse	AGGGTCAGGATACCTCTCTTGCT	23	279	257

2.17.2 Durchführung

Für die qPCR wurde ein Mastermix (Tabelle 7) vorbereitet.

Tabelle 7: Verwendete Volumina für den qPCR-Mastermix

qPCR-Mastermix:	µl
2xSYBRGreen MasterMix	10
Primer-Mix c=10µM	0,6
H ₂ O _{steril}	7,4
Summe	18
cDNA	2
Endvolumen je Well	20

Der Primer-Mix wurde für alle Primerpaare in einer Endkonzentration von 300 nM verwendet. In einer 96-Well-qPCR-Platte wurde zuerst der Mastermix in alle benötigten Wells vorgelegt. Danach wurde in einem zweiten Pipettierschritt die jeweilige cDNA hinzupipettiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Repräsentative Belegung einer 96-Well-Platte für die qPCR

	A	B	C	D	E	E	F	G
1	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
2	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
3	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
4	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
5	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
6	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
7	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
8	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
9	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
10	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
11	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos	c-fos
12	IPK β-Ak	IPK β-Ak	IPK β-Ak	IPK c-fos	IPK-c-fos	IPK-c-fos	NTC	NTC

Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. In zwei Wells wurde zum Mastermix 2 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{steril}}$ als Leerprobe (non-target-control, NTC) pipettiert. Als Interplate-Kalibratoren (IPK) wurde in jeweils drei Wells zum Mastermix eine definierte Molekülanzahl ($5 \cdot 10^5 / \mu\text{l}$) des zu untersuchenden Amplikons und des Housekeeping-Gens (β -Aktin, β -Ak) pipettiert.

Für die Real-Time qPCR wurde das ABI-Prism-7900 HT-qPCR-System verwendet. Das Thermalprogramm war 50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit 95 °C für 15 sec und 60 °C für 1 min und anschließend eine im PCR Gerät fest programmierte Dissoziationsanalyse.

2.18 qPCR-Datenanalyse

Die qPCR-Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der Datensätze aus dem ABI-Prism-7900-HT-qPCR-System durch das Programm Microsoft Excel. Es wurde eine relative Quantifizierung nach $\Delta\Delta\text{CT}$ sowie eine absolute Quantifizierung unter Berücksichtigung der eingesetzten cDNA Menge, ermittelt über das Housekeeping Gen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Writhing-Test

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Writhing-Test ist ein in der Literatur etablierter Verhaltenstest zur Detektion und Quantifizierung von viszeralem Schmerz. Das Einbringen von 200 µl einer 0,7 %-igen Essigsäure-Lösung in den Bauchraum des Versuchstieres stellt hierbei die Positivkontrolle dar, die als Trigger einen transienten viszerale Schmerzreiz auslöst, der mit typischen Bewegungsmustern einhergeht. Die charakteristischen Krümmungsbewegungen (engl. Writhing) haben dem Test seinen Namen gegeben. Als Testorganismus wird die Maus verwendet. Mäuse vom Stamm Black/6 haben sich für den Writhing-Test als geeignet erwiesen. Für die vorliegende Arbeit wurde folgendes Verhalten der Black/6-Maus als positive Writhing-Aktion gewertet:

1. Ausstrecken und Flachpressen des gesamten Körpers mit und ohne Extension der Hinterbeine
2. Krümmungsbewegungen des Rumpfes über ca. 20° mit und ohne Extension der Hinterbeine

Als eine etablierte Messgröße zur Quantifizierung der Stärke des viszerale Schmerzes wurde hier die numerische Erhebung von Writhing-Aktionen innerhalb definierter Zeitintervalle von jeweils 10 min angewendet. Die Gabe von 200 µl 0,7 %-iger Essigsäure-Lösung provoziert im vorliegenden Versuch unmittelbar nach Injektion starke, deutlich nachweisbare Writhing-Aktionen in der Black/6-Maus (Abbildung 7). Die Zahl der Writhing-Aktionen beträgt im Mittel 15 Aktionen innerhalb des ersten 10-min-Intervalls, die sich innerhalb der ersten 30 min transient auf unter 6 Writhing-Aktionen reduzieren (Abbildung 8, Seite 44). Die Anzahl der Writhing-Aktionen bleibt ab dann bis 80 min nach Injektion der Essigsäure unverändert, reduziert sich aber ab der 90. Minute auf 4 Writhing-Aktionen innerhalb eines 10-min-Intervalls und bleibt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von insgesamt 120 min stabil erhalten.

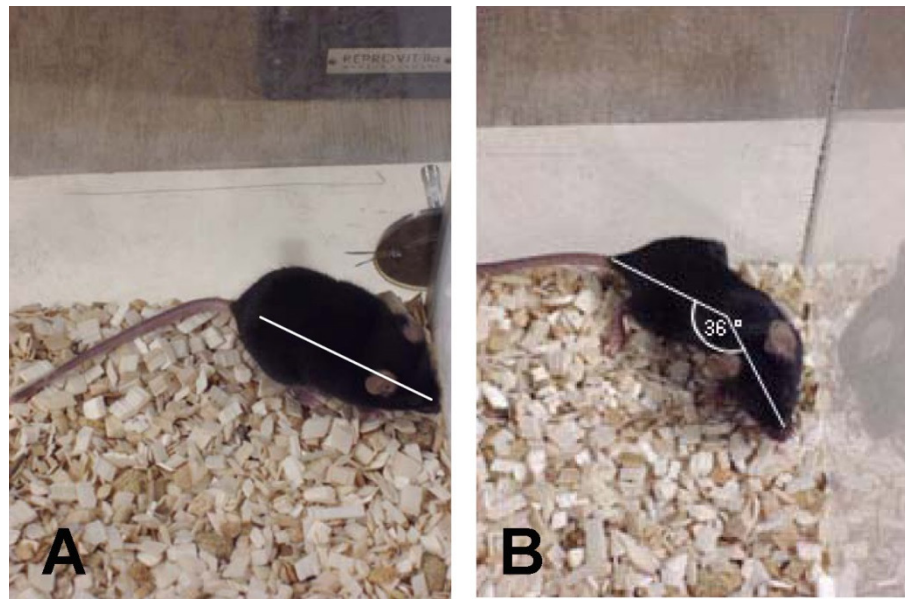


Abbildung 7: Writhing-Aktionen im Vergleich zum normalen Verhalten

A: Normale Körperhaltung einer Maus ohne Schmerzbelastung. **B:** Writhing-Aktion: typische Körperhaltung mit Neigung des Rumpfes (hier nach rechts) und einer Extension der Hinterbeine. Die Bilder zeigen Tiere in der Messbox während des Writhing-Verhaltensversuchs.

Die Daten zeigen, dass die intraperitoneale Applikation von 0,7 %-iger Essigsäure zu messbaren Anzeichen von viszeralem Schmerz führt. Als Negativkontrolle dient physiologische NaCl-Lösung, die in einem Volumen von ebenfalls 200 µl in die Peritonealhöhle eingebracht wird. Die so Schein-(Sham-) behandelten Tiere zeigen zu keinem Zeitpunkt mehr als 2 Writhing-Aktionen innerhalb eines 10-Minuten-Intervalls (Abbildung 8, Seite 44). Diese geringe Anzahl von Writhing-Aktionen ist vermutlich auf einen Schmerzreiz zurückzuführen, der durch die reine mechanische Belastung der intraperitonealen Nadelpunktion induziert wurde. Writhing-Aktionen unter zwei pro Zeitintervall werden deshalb im Folgenden als applikationsinduzierten, eher somatischen Schmerz gewertet, der nicht als ein durch eine Substanz (Essigsäure oder Gas) induzierte Schmerzempfindung des Peritoneums gewertet wird.

Die zentrale Fragestellung, die mit dem so im Labor aufgebauten Writhing-Test beantwortet werden sollte, war, ob die Insufflation eines O₃/O₂-Gasgemisches in die Peritonealhöhle mit viszeralem Schmerz

verbunden ist. Da der O_3 -Anteil des O_3/O_2 -Gasgemisches stark oxidativ wirkt und zur Bildung von zahlreichen, bisher nicht identifizierten radikalen Produkten (radical oxygen species, ROS) im Peritoneum führen kann, kann eine schmerzauslösende Wirkung nach der Insufflation nicht ausgeschlossen werden. Um zunächst den mit der intraabdominalen Insufflation von 1 ml Gas verbundenen, möglichen peritonealen Dehnungsschmerz zu erfassen, wurde reiner, medizinischer Sauerstoff in die Bauchhöhle eingebracht.

Es zeigt sich, dass der inerte Sauerstoff zu keiner Zunahme an Writhing-Aktionen über die, als Basiswerte definierten, 2 Writhing-Aktionen hinaus führt (Abbildung 8). Weder unmittelbar nach der Insufflation, noch zu irgend einem Zeitpunkt innerhalb des Beobachtungszeitraums von 120 min werden Schmerzreaktionen durch Writhing-Aktionen sichtbar.

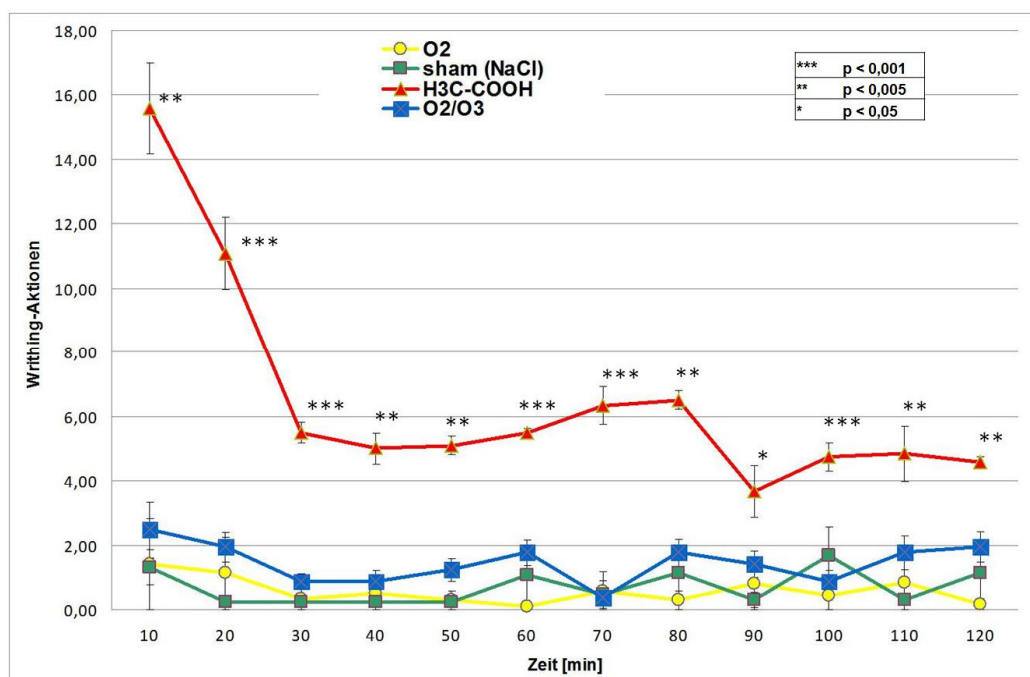


Abbildung 8: Writhing-Test

Anzahl der Writhing-Aktionen innerhalb einzelner 10-Minuten-Intervalle bei Tieren nach intraperitonealer Injektion von 200 μ l 7 %-iger Essigsäure ($H_3C-COOH$; $n = 12$), 200 μ l NaCl-Lösung (Sham; $n = 13$), oder nach Insufflation von 1 ml eines Ozon/Sauerstoff-Gasgemisches (O_3/O_2 ; $n = 10$) oder 1 ml reinen medizinischen Sauerstoffs (O_2 ; $n = 12$). Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert (mean \pm SEM). Signifikanzniveaus zwischen $H_3C-COOH$ und O_3/O_2 werden durch * für jeden Zeitabschnitt dargestellt.

3. Ergebnisse

Viszerale Schmerzen aufgrund von intraperitonealem Druck durch ein Gas können deshalb weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch nach Insufflation des radikalen O₃/O₂-Gasgemisches kommt es zu keiner Zunahme an Writhing-Aktionen über die Basiswerte hinaus (Abbildung 8). In dem Messintervall 20 min (Intervall 10 bis 20 min nach Versuchsbeginn) ist allerdings die Anzahl an Writhing-Aktionen in der O₃/O₂-Versuchsgruppe signifikant erhöht, was einen leichten, nur über kurze Zeit wahrgenommenen viszeralen Reiz reflektieren könnte. Nach diesen Ergebnissen kann das Auftreten von viszeralem Schmerz durch die intraperitoneale Anwendung von O₃/O₂-Gasgemisch im Rahmen therapeutischer Anwendungen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die statistische Analyse der Anzahl von Writhing-Aktionen der einzelnen Substanzen und / oder Gase innerhalb eines Zeitintervalls untermauert, dass lediglich die verwendete Essigsäure, nicht aber die verwendeten Gase zu sichtbarem viszeralem Schmerz führen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Statistische Auswertung der Writhing-Aktionen

Zeit [min]	NaCl (Sham)	H ₃ C-COOH	p-Wert	O ₃ /O ₂	p-Wert	O ₂	p-Wert
10	1,3 ± 0,54	15,6 ± 3,24	***	2,5 ± 0,86	n. s.	3,5 ± 1,41	n. s.
20	0,2 ± 0,22	11,1 ± 1,97	***	1,9 ± 0,46	*	2,1 ± 1,13	n. s.
30	0,2 ± 0,16	5,5 ± 0,93	***	0,9 ± 0,21	n. s.	0,7 ± 0,33	n. s.
40	0,2 ± 0,16	5,0 ± 0,99	***	0,9 ± 0,32	n. s.	0,9 ± 0,50	n. s.
50	0,2 ± 0,12	5,1 ± 1,26	***	1,2 ± 0,35	n. s.	0,5 ± 0,29	n. s.
60	1,1 ± 0,82	5,5 ± 0,77	***	1,8 ± 0,40	n. s.	0,2 ± 0,11	n. s.
70	0,5 ± 0,44	6,3 ± 1,10	***	0,4 ± 0,19	n. s.	0,7 ± 0,58	n. s.
80	1,2 ± 0,58	6,5 ± 1,41	**	1,8 ± 0,42	n. s.	0,6 ± 0,29	n. s.
90	0,3 ± 0,23	3,7 ± 0,84	***	1,4 ± 0,39	n. s.	1,7 ± 0,79	n. s.
100	1,7 ± 0,87	4,8 ± 0,90	*	0,9 ± 0,32	n. s.	0,8 ± 0,44	n. s.
110	0,3 ± 0,17	4,8 ± 1,00	***	1,8 ± 0,53	n. s.	1,6 ± 0,85	n. s.
120	1,2 ± 0,81	4,6 ± 0,87	**	1,9 ± 0,48	n. s.	0,2 ± 0,17	n. s.

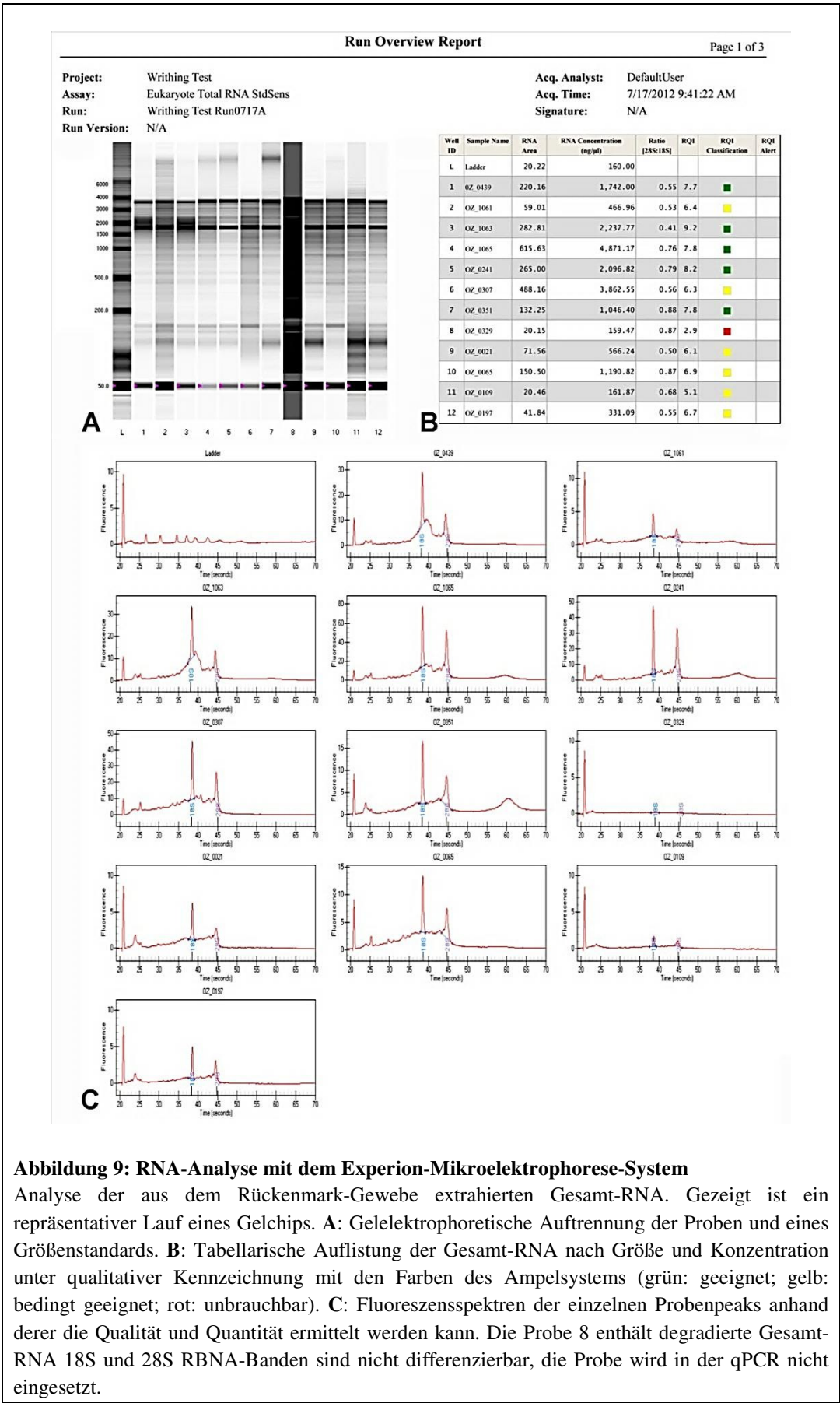
3.2 Schmerzmediatoren auf Rückenmarksebene, gemessen durch c-fos

3.2.1 Probenanalyse und Etablierung der qPCR für c-fos-Genexpression

Um eine mögliche Schmerzkomponente des O_3/O_2 -Gasgemisches im Rahmen intraperitonealer Anwendungen zu analysieren, wird neben den reinen Verhaltensbeobachtungen auch eine molekularbiologische Analyse auf Rückenmarksebene durchgeführt. Im Rückenmark liegen die 2. Neurone der Schmerzbahn, sowohl viszerosensibler als auch somatosensiblen Afferenzen, die auf diesen Reiz mit einer induzierten oder erhöhten Aktivität reagieren. Im Tiermodell hat sich das Protoonkogen c-fos als Markerprotein auf Rückenmarksebene etabliert, das schnell und direkt auf nozizeptiven Input in Neuronen im Hinterhorn induziert wird (Coggeshall, 2005).

Mittels der Methode der quantitativen Realtime RT-PCR Analyse wurde die Genexpression der c-fos mRNA im Rückenmark direkt im Anschluss an die Beobachtungszeit von 120 min nach Start des Writhing-Tests gemessen. Um mehrere Segmente des Rückenmarks zu berücksichtigen, wurde Gesamt-RNA aus dem thorakolumbalen Rückenmarksabschnitt isoliert und auf Reinheit und Unversehrtheit mittels der Mikrogelelektrophorese im Experion gemessen (Abbildung 9, Seite 47).

Um eine absolute Quantifizierung der c-fos-mRNA im Gewebe durchführen zu können, ist es notwendig, eine Standardkurve mit bekannten Mengen an der zu amplifizierenden c-fos-DNA zu erhalten. Mittels des Oligonukleotid-Primerpaares für c-fos wurde zunächst aufgereinigte Gesamt-RNA aus einer Rückenmarksprobe von der Maus revers transkribiert, die c-fos-Transkripte in dieser cDNA in einer PCR amplifiziert und die so generierten c-fos-cDNA-Templates aufgereinigt und



3. Ergebnisse

quantifiziert. Eine Verdünnungsreihe dieser c-fos-cDNA-Templates wurde entsprechend den Angaben in Material und Methoden erstellt und in der qPCR eingesetzt. Die resultierende Standardkurve zeigt eine Nachweisgrenze von 5×10^4 c-fos-cDNA-Templaten bei einer Korrelation der linearen Regressionsgraden von 96,0% (Abbildung 10 A). Aus der Steigung der Standardkurve ergibt sich eine Primereffizienz von 91,5 % entsprechend der Formel: $\text{Effizienz} = 10^{(1-\text{Steigung})} - 1$.

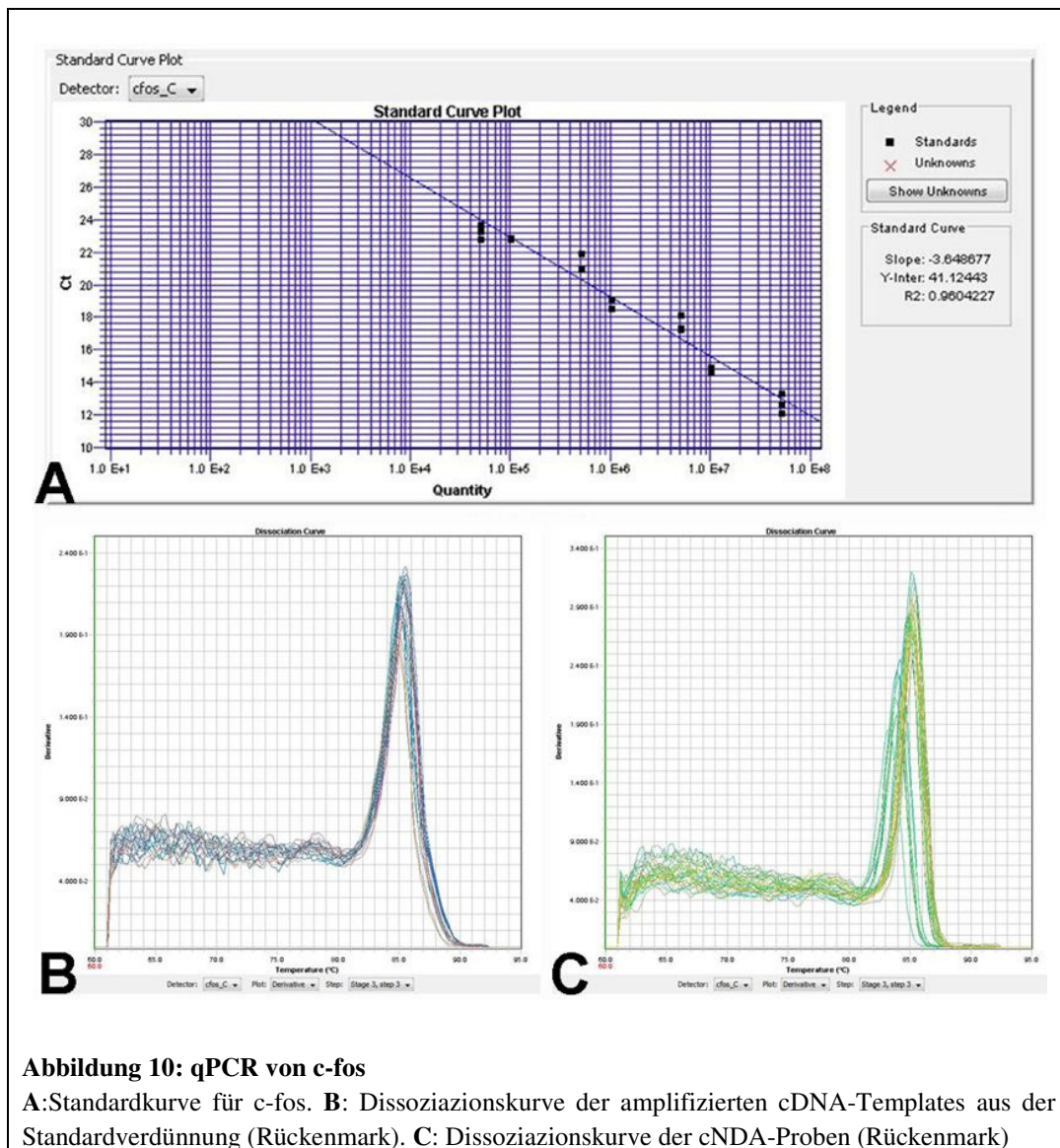


Abbildung 10: qPCR von c-fos

A: Standardkurve für c-fos. **B:** Dissoziationskurve der amplifizierten cDNA-Templates aus der Standardverdünnung (Rückenmark). **C:** Dissoziationskurve der cNDA-Proben (Rückenmark)

Um die Spezifität der verwendeten Primer zu zeigen, wurde eine Schmelztemperaturanalyse im Anschluss an die qPCR durchgeführt. Bei

dieser Analyse macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass doppelsträngige Amplifikationsprodukte mit derselben Sequenz bei einer definierten Temperatur gleichzeitig dissoziieren. Dies ist mit einem plötzlichen Abfall der Fluoreszenz bei Erreichen der für das Template spezifischen Schmelztemperatur verbunden, welche im temperaturabhängigen Fluoreszenzdiagramm dargestellt werden kann (Abbildung 10 B, C). Der definierte Peak und der steile Abfall in der Fluoreszenz bei Erreichen der Schmelztemperatur von hier 85,0 °C zeigen die hohe Spezifität des verwendeten c-fos-Primerpaares.

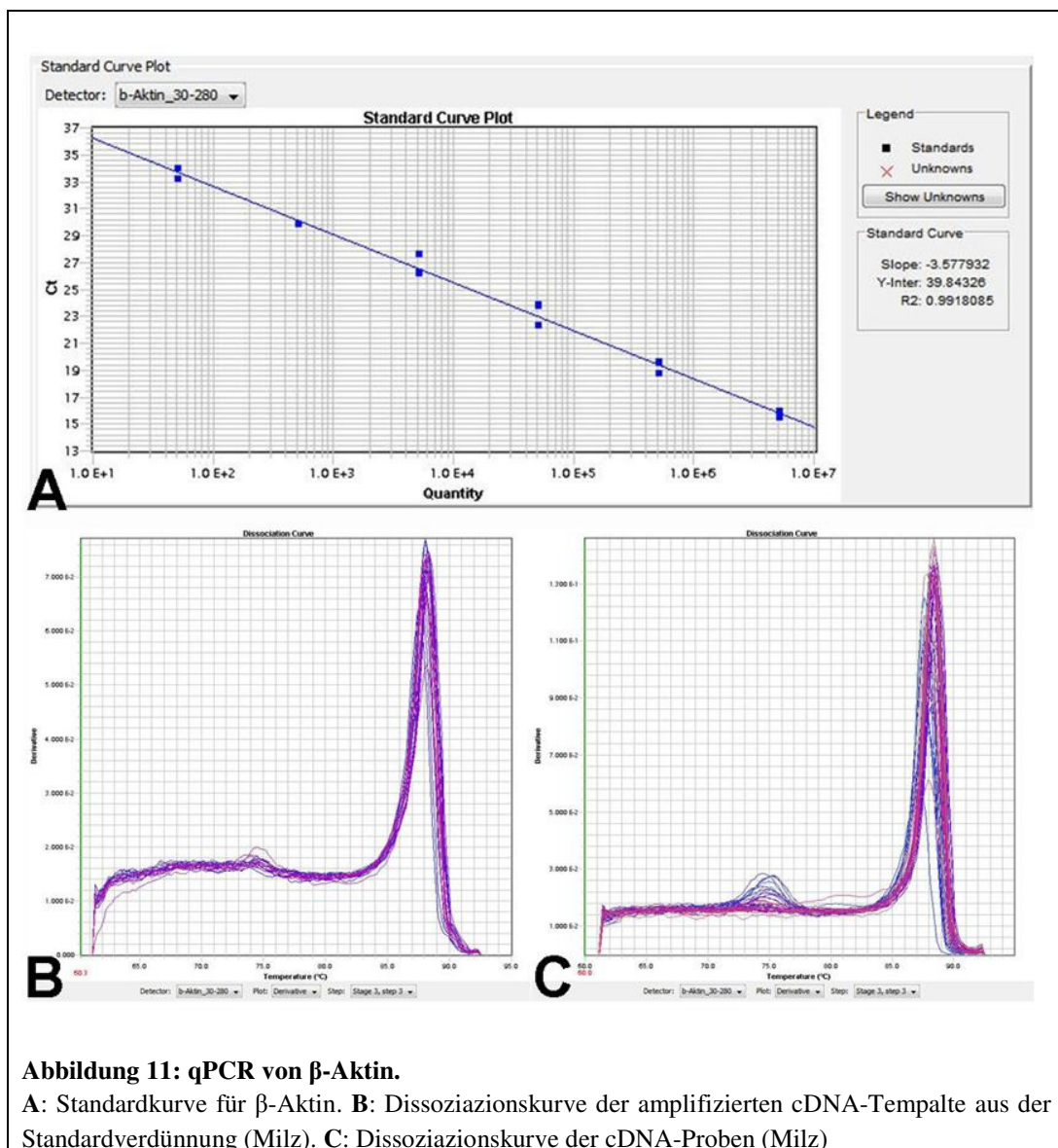
Zur Normierung und Angleichung aller Proben auf einer definierten Ausgangsmenge an cDNA, die in der qPCR eingesetzt wurde, wird die Expression eines sogenannten Housekeeping-Gens einem Gen, welches bekanntermaßen in dem Probengewebe durch die Behandlung der Versuchsgruppen nicht reguliert wird, quantifiziert. Für die Analysen am Rückenmark (als auch der weiteren Gene in der vorliegenden Arbeit) wurde das β -Aktin-Gen als Housekeeping-Gen verwendet. Analog zu den c-fos-Genen wurde für β -Aktin eine Standardkurve hergestellt. Diese zeigt eine Korrelation der linearen Regressionsgraden von 99,2 % und eine Primereffizienz von 90,3 % (Abbildung 11, Seite 50). Die Schmelzkurve der Amplifikate zeigt eine sehr hohe Spezifität.

3.2.2 Expression der c-fos-mRNA im Rückenmark nach dem Writhing-Test

Zum Vergleich der Expressionsspiegel von mRNA-Transkripten in Proben von verschiedenen experimentellen Gruppen verwendet man am häufigsten die delta-delta($\Delta\Delta$)Ct Methode im Anschluss an eine RT-qPCR. Bei dieser Art der Auswertung wird in jeder Probe der ermittelte Ct-Wert für das Zielgen (in diesem Fall c-fos) vom Ct-Wert eines nicht regulierten Housekeeping-Gens (in diesem Fall β -Aktin) abgezogen, was den Δ Ct-Wert ergibt. Um die n-fache Veränderung des Zielgens (c-fos)

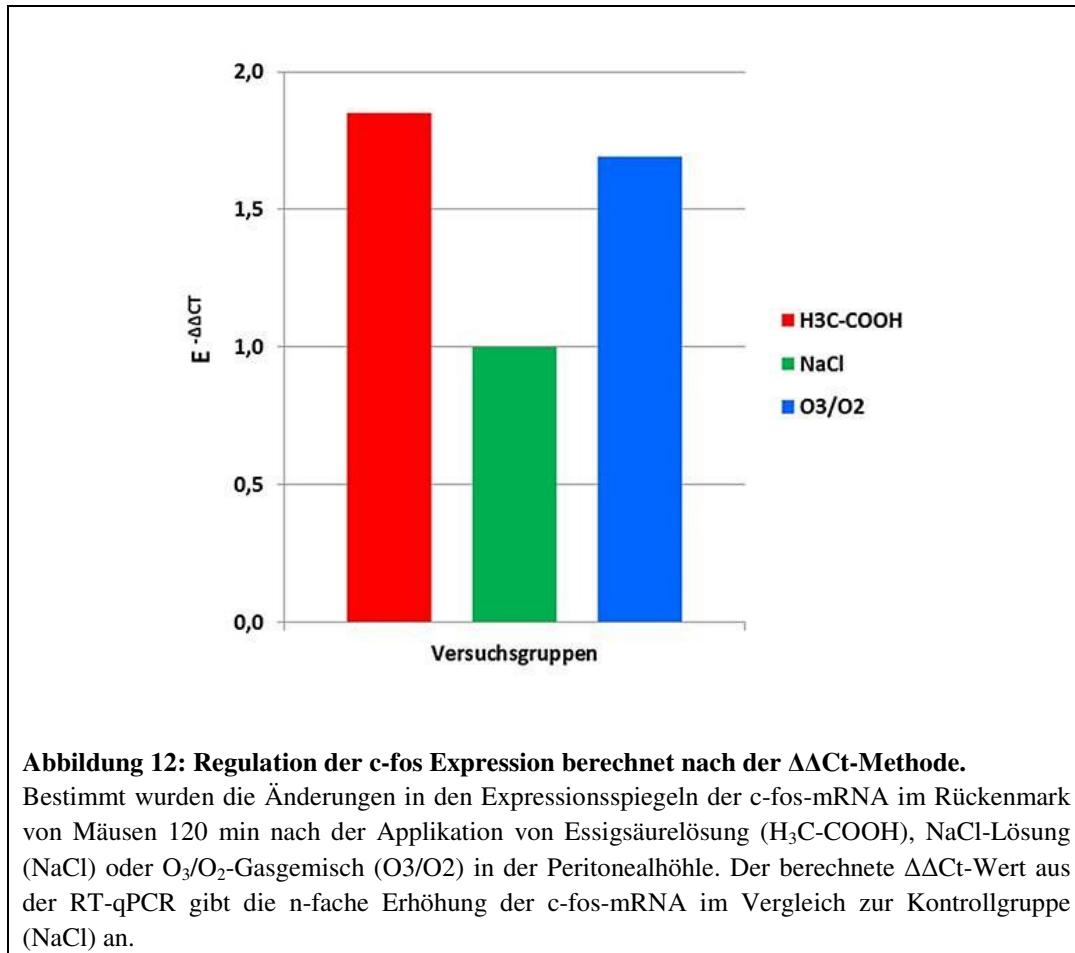
3. Ergebnisse

zwischen den Versuchsgruppen zu ermitteln, wird nun der Mittelwert aus allen ΔCt -Werten einer Gruppe berechnet und vom Mittelwert des ΔCt einer Vergleichsgruppe abgezogen (ergibt den $\Delta\Delta Ct$ -Wert). Bei der c-fos-Analyse wurde die Sham-Versuchsgruppe (mit NaCl behandelt) als Referenz gesetzt, von der die Versuchsgruppen Essigsäure bzw. O_3/O_2 abgezogen wurden. Werte größer als 1,0 bedeuten eine Hochregulation des Zielgens gegenüber der Expression in der Kontrollgruppe.



Die Analyse nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ergibt in der Gruppe der mit Essigsäure behandelten Tiere eine 1,9-fache Hochregulation der

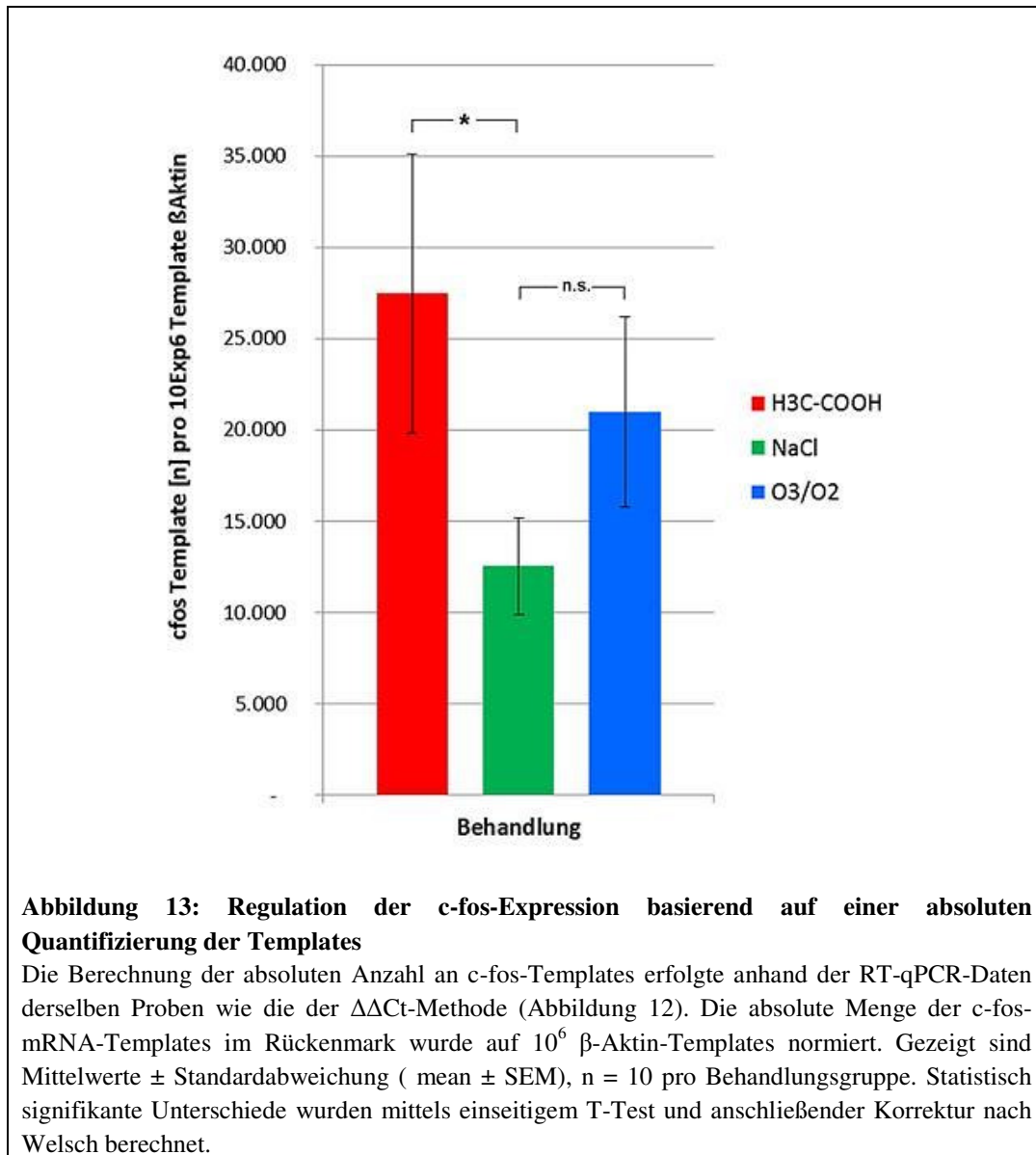
c-fos-mRNA im Rückenmark. Für die Gruppe der O₃/O₂-behandelten Tiere ergibt sich eine Hochregulation um das 1,7-Fache (Abbildung 12).



Die Werte weisen auf eine, wenn auch nur schwache, Zunahme der c-fos-mRNA in den O₃/O₂-behandelten Tieren hin, die im Trend eher an die Expressionsspiegel von c-fos in den durch Essigsäure mit viszeralem Schmerz belasteten Tieren heranreicht als an die basale c-fos-Expression in den Sham-behandelten NaCl-Tieren. Eine Schmerzantwort in den O₃/O₂-behandelten Tieren kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, auch wenn die für chemische Noxen typischen Writhing-Aktionen ausgeblieben sind.

Da bedingt durch das mathematische Verfahren der $\Delta\Delta C_t$ -Methode keine Standardabweichungen für die Expressionsunterschiede ermittelt werden können, wurde zusätzlich eine absolute Quantifizierung der im

Rückenmark vorliegenden c-fos-mRNA-Templates sowie der β -Aktin-mRNA-Templates durchgeführt. Hierzu wurden mittels der Standardkurve die absolute Zahl der in der Probe vorhandenen β -Aktin-Templates bzw. der c-fos-Templates berechnet.



Die c-fos-Templates wurden anschließend auf 10^6 Templates β -Aktin in der jeweiligen Probe normiert (Abbildung 13).

Die statistische Auswertung, die durch die absolute Quantifizierungsmethode möglich wurde, untermauert damit die Messung nach der $\Delta\Delta C_t$ -

Methode, die basierend auf der Genexpression des neuronalen Aktivitätsmarkers c-fos eine Aktivierung der Schmerzbahn im Rückenmark durch peritoneal-applizierte Essigsäurelösung zeigt. Sie lassen darüber hinaus eine schmerzinduzierende Wirkung des O₃/O₂-PP vermuten.

3.3 Immunstimulation in der Milz, gemessen durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6

Die Generierung von ROS im Bauchraum bedingt durch die Insufflation des O₃/O₂-Gasgemisches kann neben möglichen schmerzauslösenden Wirkungen auch Auswirkungen auf das Immunsystem haben. Da die Zusammensetzung der ROS, ebenso wie deren biologische Auswirkung weitestgehend unbekannt ist, ist es deshalb möglich, dass es zu Entzündungsreaktionen im Peritoneum kommt, die ähnlich einer Sepsis zur pathologischen Expression von Zytokinen führen. Für zukünftige therapeutische Anwendungen des O₃/O₂-PP ist es deshalb wichtig zu wissen, ob derartige unerwünschten Wirkungen auftreten und, im Falle eines Auftretens, ihre Stärke zu charakterisieren. Hierzu wurden die Genexpressionsspiegel der klassischen proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 gemessen. Um deren lokale Expression im Abdomen zu bestimmen, wurde in der Arbeit die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-6 im lymphatischen Gewebe der Milz untersucht.

Um sicher zu stellen, dass die für die qPCR eingesetzten RNA-Proben integer waren, wurde entsprechend der Proben aus dem Rückenmark (siehe 5.2.1) die Größe und Qualität der gewonnenen RNA-Fragmente durch Elektrophorese mit dem Experion-System überprüft, die RNA quantifiziert und revers transkribiert. Ebenso wurden cDNA-Templates für die murinen IL-1 β und IL-6 aus der Milzprobe einer C57BL/6 Maus gewonnen und Standardkurven hergestellt. Eine Übersicht über die Validität der Primer und der Standardkurven ist in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10: Sensitivität, Korrelationsfaktor, Primereffizienz der Standardkurve für IL-1 β und IL-6

cDNA-Template	Sensitivität Template [n]	Korrelationsfaktor R ² [%]	Primereffizienz [%]
IL-1 β	$\geq 5 \cdot 10^2$	99,9	94,0
IL-6	$\geq 5 \cdot 10^1$	99,9	90,1

Um Veränderungen (Erhöhung oder Reduktion) in der Genexpression von Zytokinen zu analysieren, wurden die basalen Expressionsspiegel von IL-1 β und IL-6 in der Milz von Sham-behandelten Tieren als physiologischer Basiswert bestimmt. Mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ergab sich in den Versuchsgruppen bei beiden Zytokinen nur marginale Veränderungen in den Expressionsspiegeln. Für IL-1 β betrug diese das +1,055-Fache in der Essigsäuregruppe und das +1,114-Fache in der O₃/O₂-Gruppe; für IL-6 das +1,302-Fache in der Essigsäuregruppe und das 1,525-Fache in der O₃/O₂-Gruppe (Abbildung 14, Seite 54).

Die Analyse der Genexpressionsspiegel von IL-1 β und IL-6 nach der absoluten Quantifizierungsmethode bestätigt die Daten der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, die eine nur marginale Veränderung in den Expressionsspiegeln zwischen den Versuchsgruppen zeigen (Abbildung 15, Seite 56). Die statistische Analyse zeigt keine Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen. Dies gilt sowohl für die Expressionsspiegel von IL-1 β -mRNA als auch von IL-6-mRNA (Tabelle 11, Seite 56).

Die Auswertung der Expressionsspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 ergeben, dass die O₃/O₂-Insufflation ebenso wie das Einbringen einer Essigsäurelösung in den Bauchraum der Maus keine direkte immunstimulatorische Wirkung vergleichbar der einer mikrobiellen Sepsis hat.

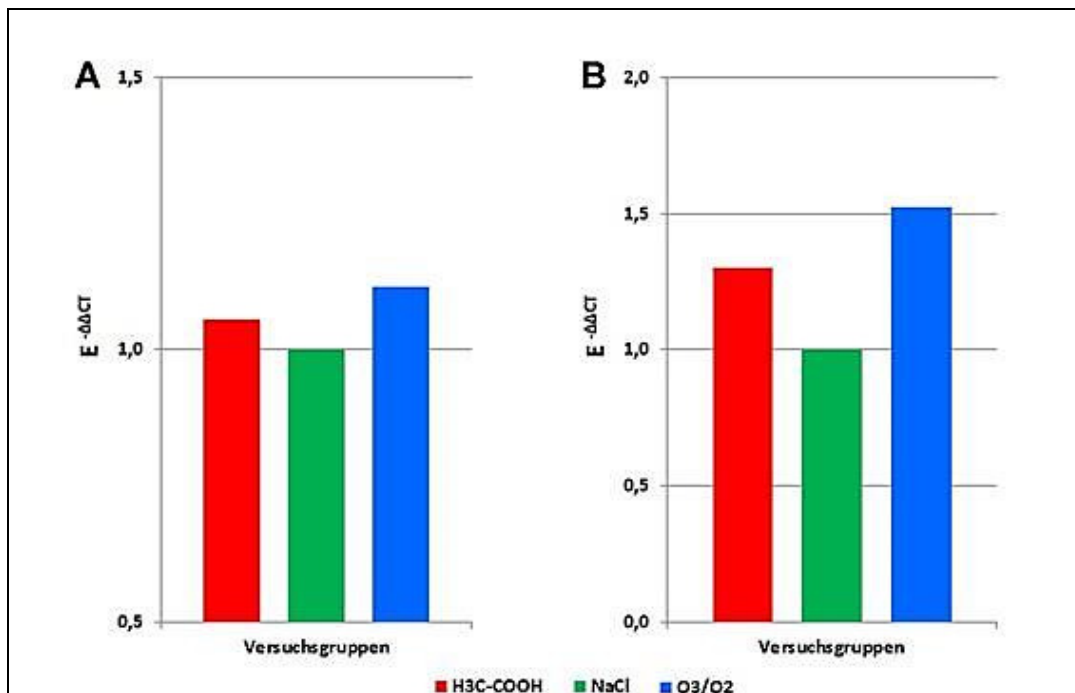


Abbildung 14: Änderungen der Expressionsspiegel von IL-1β- und IL-6-mRNA berechnet nach der ΔΔCt-Methode

Veränderungen in den Expressionsspiegeln von IL-1β-mRNA (A) und IL-6-mRNA (B) in der Milz von Mäusen unmittelbar im Anschluss an den Writhing-Test. Versuchsgruppen wurden behandelt mit der Gabe von Essigsäure (H₃C-COOH), NaCl-Lösung (NaCl) oder O₃/O₂-Gasgemisch (O₃/O₂) in die Peritonealhöhle. Der ΔΔCt-Wert gibt die n-fache Erhöhung der jeweiligen mRNA im Vergleich zur Expression der mRNA in Sham-Tieren (NaCl) an.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass ein viszeraler Schmerz, wie er sich im etablierten Writhing-Test durch intraperitoneale Injektion von Essigsäure induzieren lässt, nicht durch die O₃/O₂-Gasinsufflation hervorgerufen wird. Eine erhöhte neuronale Aktivität im Rückenmark, die auf eine Aktivierung aufsteigender Schmerzbahnen schließen lässt, wird aber dennoch nach der O₃/O₂-Gasinsufflation sichtbar, so dass eine Schmerzwahrnehmung nicht ausgeschlossen werden kann. Nebenwirkungen in Form einer proinflammatorischen Wirkung lassen sich nicht nachweisen. Für zukünftige therapeutische Anwendungen eines O₃/O₂-PPs bedeutet dies, dass bei dem Eingriff akut ein angemessenes Schmerzregime angewendet werden sollte, eine direkte pathologische Aktivierung des Immunsystems aber nicht zu erwarten ist.

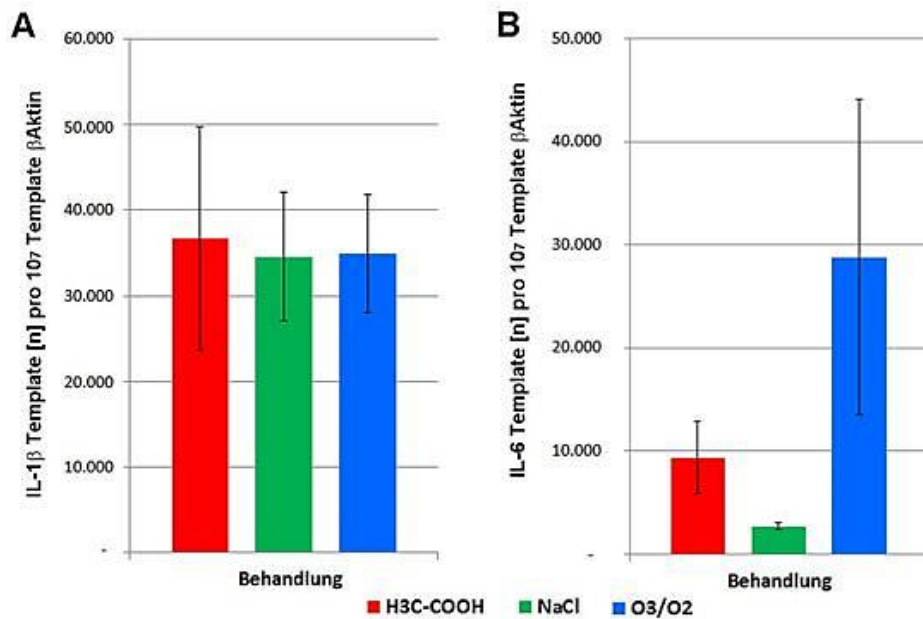


Abbildung 15: Regulation der IL-1β- und IL-6-mRNA basierend auf einer absoluten Quantifizierung der Templates

Die Berechnung der absoluten Anzahl an IL-1β- (A) und IL-6- (B) Templates erfolgte anhand der RT-qPCR-Daten derselben Milz-Proben wie die der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die absolute Menge der IL-1β- bzw. IL-6-mRNA-Templates wurde auf 10^6 Templates β-Aktin normiert. Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichen (mean \pm SEM); n = 10 pro Behandlungsgruppe.

Tabelle 11: p-Werte für den Vergleich der Behandlungsgruppen für die IL-1β- und IL-6-Templates

cDNA-Templates	Verglichene Versuchsgruppen	p-Wert*
IL-1β	H ₃ C-COOH gegen NaCl	0,8873
	O ₃ /O ₂ gegen NaCl	0,9700
	H ₃ C-COOH gegen O ₃ /O ₂	0,9062
IL-6	H ₃ C-COOH gegen NaCl	0,1362
	O ₃ /O ₂ gegen NaCl	0,1257
	H ₃ C-COOH gegen O ₃ /O ₂	0,0915

Der p-Wert (von propability; engl. Wahrscheinlichkeit) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Nullhypothese, d.h. die Annahme, dass die zwei verglichenen Versuchsgruppen gleich sind, zutrifft. Je kleiner der p-Wert, umso wahrscheinlicher ist ein Unterschied zwischen den Gruppen. Signifikante Unterschiede werden ab $p < 0,05$ angenommen. Berechnet nach zweiseitigem T-Test mit Welch-Korrektur.

4. Diskussion

4.1 Ozon und Sauerstoff – zwei reaktive Gase

Als wichtige Bestandteile der Gashüllen der Erde stellen Ozon (O_3) und Sauerstoff (O_2) essenzielle Grundstoffe für die Sicherung biologischen Lebens auf unserem Planeten dar. Sauerstoff ist ein wichtiges Substrat der mitochondrialen Atmungskette, der wichtigsten Energiequelle für eukaryotisches Leben. Die Ozonschicht schützt die Erde in der Stratosphäre vor übermäßiger ultravioletter Strahlung (Crutzen et al., 1975).

In Abhängigkeit von ihrer Konzentration und vom Partialdruck zeigen beide Gase aber auch toxische Eigenschaften auf den Organismus. Bodennahes Ozon kann bei Einatmung u. a. zu bronchialer Hyperreaktivität und Hyperpermeabilität des respiratorischen Epithels führen (Uysal und Schapira, 2003). Ein über längere Zeit stark erhöhter Sauerstoffpartialdruck in der Atemluft führt zur Zell- und Gewebeerstörung (Rahman, Biswas et al., 2006). Auslöser dieser toxischen Effekte ist bei beiden Gasen die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS). Das deutlich reaktivere der beiden Gase ist Ozon. Es ist um das 1,6-Fache dichter und um das 10-Fache löslicher in Wasser als Sauerstoff (Bocci, 2006). Dieses hohe Reaktivitätspotenzial erlaubt es Ozon, mit jeder Art von organischem Material zu reagieren. Viele Biomoleküle (z.B. Fettsäuren, Proteine, Nukleinsäuren und verschiedene Elektronendonatoren) können durch Ozon verändert (Pryor et al., 1986; Giamalva, Church et al., 1985, 1986 a, 1986 b) und damit zu protektiven oder pathogenen Faktoren werden.

4.1.1 Ozon und seine Reaktivität im Gewebe

Aufgrund der Instabilität und der hohen Reaktivität von Ozon stellt sich die Frage, ob

1. die biologischen Wirkungen des Gases auf den Organismus ein Eindringen in ein Gewebe oder eine Zelle voraussetzen,
2. bereits ein Kontakt an der äußeren Grenzfläche von organischen Materialien ausreicht oder
3. Ozon schon vor direktem Kontakt mit Geweben oder Zellen Reaktionsprodukte bilden kann, die dann, im Sinne von Mediatoren, dessen biologische Wirkung vermitteln.

Anhand eines Rechenmodells (Einstein-Smoluchowski-Gleichung), welches die Halbwertszeit von Ozon und dessen Diffusionsgeschwindigkeit durch Zellen berücksichtigt, konnte gezeigt werden, dass Ozon biologische Membranen mit höchster Wahrscheinlichkeit nicht durchdringen kann. Für das Passieren einer biologischen Membran von 10 nm Dicke benötigt Ozon rechnerisch $50 \cdot 10^{-8}$ sec. Damit ist die Passagezeit von Ozon länger als seine Halbwertszeit innerhalb einer biologischen Membran, welche bei $7 \cdot 10^{-8}$ sec liegt. Daraus lässt sich schließen, dass der Großteil des Ozons innerhalb biologischer Membranen mit Membranbestandteilen reagiert. Ein wesentlicher Faktor für die Reaktivität stellt hierbei der Gehalt an Ozon-Zielmolekülen wie Fettsäuren und Thiolen in der Membran dar. Bei Zellen, die von einer Schutzschicht, wie beispielsweise Pneumozyten von Surfactant, überzogen sind, konnte rechnerisch ermittelt werden, dass keine Interaktion zwischen Zellen und Ozon stattfindet, sondern, dass Ozon in wässriger Lösung Reaktionsprodukte bildet, die an den Zellen zu entsprechenden Effekten führen (Pryor, 1992). Die Bildung von ROS scheint also ein wesentlicher Bestandteil der biologischen Wirkung von Ozon auf den Organismus zu sein. Dieser Wirkmechanismus könnte auch für das im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Bauchraum insufflierte O_3/O_2 -Gasgemisch im wässrigen Milieu der serösen Peritonealhäute gelten.

4.1.2 Wirkung von Ozon auf definierte Zellpopulationen

Die meisten Analysen von zellspezifischen Effekten von Ozon stammen aus Studien zu toxischen Wirkungen von Ozon auf die Lunge. Die Inhalation von Ozon beeinflusst hier eine ganze Reihe von Zelltypen was zu Zellschäden, Apoptose, aber auch Zellreparatur führen kann. Die Wirkungen beinhalten aber auch die Produktion von Mediatoren wie Zytokinen oder Chemokinen und eine damit verbundene Rekrutierung von Immunzellen (zur Übersicht siehe Li, Tighe et al. 2013). Sicher scheint aber heute, dass die Wirkung von Ozon, ob schädlich oder protektiv von einer Kaskade aktivierter Zellen und Faktoren zu einer komplexen Antwort führt, bei der fast immer Immunzellen involviert sind.

Die erste Zellart, die bei der Inhalation von Ozon durch das Radikal direkt beeinflusst wird, scheinen Epithelzellen des Nasen-Rachen-Raums zu sein. In-vitro-Analysen zeigen einen direkten Effekt von Ozon auf primäre humane Epithelzellen aus der Nase und einen über Zell-Zellkontakt vermittelten Attenuierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Müller, Brighton et al 2013). Eine derartige Suppression von NK Zellen durch Ozon in der Lunge und eine damit verbundene Reduktion entzündungsinduzierter Pathologien wurden bereits in früheren Studien gezeigt (Burleson, Keynes et al., 1989; Van Loveren, Krajnc et al., 1990). Auf der anderen Seite kann eine repetitive Ozoninhalation zu einer gesteigerten Akkumulation von NK-Zellen und dadurch zur Hyperreaktivität in den Atemwegen führen (Pichavant et al., 2008). Natürliche Killerzellen sind als Produzenten von zytotoxischen Faktoren wie Granzymen oder Perforin im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr bekannt. Dies könnte ein weiterer Wirkmechanismus des Ozons in Bezug auf die Lungentoxizität darstellen.

Makrophagen, die ozonhaltiger Luft ausgesetzt wurden, zeigten in vitro eine deutlich gesteigerte Phagozytoserate und eine erhöhte Produktion von PGE_2 und Superoxiden (Becker et al., 1991a). Ob eine direkte in-vitro-Stimulation von Makrophagen durch Ozon diese auch zu einer

gesteigerten Zytokinproduktion anregt (Ishii et al., 1997; Larini et al., 2005) oder eher zu suppressiven Effekten führt (Becker et al., 1991b; Janic et al., 2005), ist nicht eindeutig geklärt. *In vivo* kommt es bei ozoninduzierten Lungenschädigungen im Verlauf der Erkrankung zu einer gesteigerten Produktion von Hyaluronsäure, welche dann in Makrophagen, die sich lokal in den geschädigten Bereichen ansammeln, die Produktion von Zytokinen induziert (Garantziotis et al., 2009). Eine milde Ozoninhalation hingegen, welche bei Mäusen nicht direkt zu Schäden am Lungengewebe führt, induziert zunächst eine gesteigerte Apoptoserate von Alveolarmakrophagen. Führt man nun eine Provokation der Tiere durch Inhalation von Lipopolysacchariden durch, so treten signifikant abgemilderte pulmonale Entzündungsreaktionen auf. (Hollingsworth et al., 2007). Dieser protektive Effekt des Ozons auf die Lunge scheint in der partiellen Depletion der Alveolarmakrophagen begründet. In diesem Modell muss allerdings berücksichtigt werden, dass durch die Inhalation von Ozon neben den Alveolarmakrophagen auch eine ganze Reihe weiterer Zellpopulationen des Immunsystems beeinflusst werden können.

Eine weitere Immunzellsubpopulation der Lunge, die durch Ozon beeinflusst wird, und die dadurch weitere pulmonale immunologische Abläufe reguliert, ist die $CD4^+$ -T-Helferzelle ($CD4^+$ -T_H). So beobachtete man in der bronchoalveolären Flüssigkeit von $CD4$ -supprimierten Mäusen im Vergleich zu nicht-supprimierten Mäusen nach Ozonexposition einen signifikant reduzierten Gehalt an Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Chen et al., 1995).

Der Einfluss von Ozon auf neutrophile Granulozyten ist derzeit noch unklar. Einige Studien beschreiben, dass Neutrophile nicht mit einer ozoninduzierten pulmonalen Immunreaktion in Verbindung stehen (Koto et al., 1997; Park et al., 2004). Andere Studien wiederum demonstrieren, dass neutrophile Granulozyten an der Vermittlung pulmonaler Hyperreaktivität infolge Ozonexposition beteiligt sind (DeLorme, 2002).

Ein interessanter Aspekt von Ozon, der möglicherweise von therapeutischem Nutzen sein könnte, basiert auf der Beobachtung, dass Ozon direkte und indirekte Effekte auf Tumorzellen hat. In-vitro-Analysen zum direkten Effekt von Ozon auf Tumorzelllinien zeigten, dass das Wachstum von humanen Lungen-, Mamma- und Uteruskarzinomzellen durch eine kontinuierliche direkte Ozonexposition inhibiert wird (Sweet et al., 1980). Erste ozonbasierte tumortheraeutische Ansätze konnten nachweisen, dass eine intraperitoneale Insufflation von Ozongas in Kombination mit einer Radiotherapie zu einem strahlensensibilisierenden Effekt führt. Bei 39% der Ratten unter kombinierter Ozon-Radiotherapie zeigte sich makroskopisch die Remission eines Walker-Karzinoms, während es bei Ratten unter alleiniger Radiotherapie zu 100% zur Ausbildung eines Walker-Karzinoms kam (Hernuss et al., 1974). Dieser tumortheraeutische Ansatz, bei dem ein O_3/O_2 -Gasgemisch insuffliert und dadurch ein Pneumoperitoneum (PP) induziert wurde, scheint eine hohe systemische Wirksamkeit gegen Tumore zu haben. Eine neuere Studie konnte eine effiziente, antitumorigene Wirkung der O_3/O_2 -PP-Therapie auf einen squamösen Hauttumor (Schulz et al., 2008) zeigen. In dieser Studie konnte besonders die Beteiligung des Immunsystems als zentrales Element der tumorremittierenden Wirkung gezeigt werden.

4.2 Pneumoperitoneum

Im Bereich der Humanmedizin ist die intraperitoneale Insufflation von medizinischen Gasen etabliert. Das sogenannte Pneumoperitoneum wird bei zahlreichen operativen Abdominaleingriffen verwendet, um die Bauchdecke von den Eingeweideorganen abzuheben und dem Chirurgen die Sicht auf den Operationssitus zu ermöglichen. Bei einem operativen Pneumoperitoneum wird das Gas in der Regel über einen in einem Trokar verbauten Ventilmechanismus mit einem definierten Druck in die Peritonealhöhle eingeleitet und das gesamte Abdomen aufgebläht. Die

damit verbundene Anspannung des peritonealen Gewebes verursacht Dehnungsschmerzen, die sich u. a. als postoperative Schulterschmerzen manifestieren. Eine kritische Größe stellt hier der maximal erzeugte intraabdominelle Druck dar. Es konnte gezeigt werden, dass ein niedriger Druckgradient während einer laparoskopischen Cholezystektomie im Vergleich zum normal üblichen Druck zu signifikant weniger postoperativen Schulterschmerzen und zu weniger postoperativem Analgetikakonsum führt (Gurusamy, K. et al., 2009). Bei der Parietographie, einem Verfahren zur radiologischen Bildgebung (Frimann-Dahl et al., 1962). der Wand eines Hohlorgans nach Kontrastmittelapplikation inner- u. außerhalb des Organs (z.B. Pneumozystographie, Pneumoperitoneum) dient O_2 als Kontrastmittel. Diese Methode ist aber heute weitgehend durch moderne bildgebende Verfahren abgelöst. Bei der Entwicklung laparoskopischer Operationstechniken wurde ebenfalls mit der intraperitonealen Insufflation von O_2 experimentiert. Die Methode wurde aber verlassen, da bei der Elektrokoagulation unter O_2 -Pneumoperitoneum lebensgefährliche Explosionen auftraten (Menes et al., 2000).

4.3 Wirkung von Ozon im Peritoneum auf die viszerale Schmerzwahrnehmung

Eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war es, ob die intraperitoneale Insufflation von einem reaktiven O_3/O_2 -Gasgemisch zu Schmerz führt. Hier muss differenziert werden, ob ein möglicher Schmerz durch

1. einen reinen Dehnungsschmerz oder
2. durch die stark oxidative Eigenschaft des radikalen Gases entsteht.

Die Möglichkeit, dass Dehnungsschmerzen bedingt durch den zu erwartenden erhöhten intraabdominellen Druck auftreten, wird als eher gering und vernachlässigbar für das hier verwendete Maus-Tiermodell

eingestuft, da das insufflierte Volumen von insgesamt nur 1 ml Gas in das Peritoneum rechnerisch unter 10 % des Peritonealvolumens von Mäusen liegt. Darüber hinaus kam es nach Injektion des Gases nicht zu einem gespannten und deutlich aufgeblähten Abdomen.

Um eine mögliche schmerzauslösende Komponente durch die stark oxidative Eigenschaft des Ozons zu erfassen, führten wir den etablierten Writhing-Test durch (Le Bars et al, 2001). Mit diesem Test ist es möglich, abdominale Schmerzen, die durch chemische Agenzien im Peritoneum hervorgerufen werden, über charakteristische Verhaltensäußerungen zu erfassen und zu quantifizieren. Hierbei dient die Anzahl von Krümmungs- und Streckbewegungen des Rumpfes als *Readout*. Die Injektion von 1 ml reinem O₂, das als Kontrollgas für das insufflierte Volumen und auch für das im O₃/O₂-Gasgemisch vorhandene O₂ diente, führte zu nur vereinzelt und über den Beobachtungszeitraum von 2 h zahlenmäßig gleichbleibenden Schmerzreaktionen, was die Einschätzung bestätigt, dass das applizierte Gasvolumen keinen ausgeprägten Dehnungsschmerz hervorruft. Die Beobachtung vereinzelter Schmerzreaktionen wird als Reaktion auf den erfolgten Nadelstich zur Applikation des Gases in das Abdomen gewertet. Unterstützt wird diese Annahme durch die ebenfalls vereinzelt Reaktionen nach Gabe von physiologischer NaCl-Lösung in die Bauchhöhle.

Eine chemische Noxe durch das reaktive O₃/O₂-Gasgemisch und damit verbundene Schmerzen konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Ausschließlich die als Testsubstanz zur Induktion von Schmerzen verwendete Essigsäure-Lösung induzierte transient signifikant messbare Schmerzreaktionen und bestätigt damit die Funktionalität des hier verwendeten Writhing-Testsystems und die Eignung des verwendeten Mausstammes C57BL/6. Analysen von elf verschiedenen, kommerziell erhältlichen Labormausstämmen haben gezeigt, dass die Empfindlichkeit von Schmerzen bei C57BL/6 Mäusen im repräsentativen Mittel liegt, und die Mäuse klare Verhaltensantworten auf die Induktion von viszeralem

Schmerz zeigen, ohne davon übermäßig stark belastet zu sein (Mogil et al., 1999). Eine moderate Belastung der Tiere erschien uns wichtig für die Untersuchungen der Expressionsspiegel von Zytokinen, da wir keine immunsupprimierenden Nebeneffekte durch hohe Steroidspiegel erhalten wollten.

Um mögliche Schmerzreaktionen zusätzlich zu dem Verhaltenstest zu erfassen, wurden molekularbiologische Analysen im Rückenmark durchgeführt. Die Schmerzbahn leitet unter Oberflächenschmerzen auch viszerale Schmerzempfindung über die Tractus spinothalamicus lateralis und anterior im Rückenmark ins ZNS. Auftretende Schmerzsignale korrelieren hier mit einer Erhöhung der Expressionsspiel von c-fos-mRNA in Neuronen des Rückenmarks (Coggeshall, 2005).

Die eigenen Ergebnisse zeigen erwartungsgemäß eine geringe aber klar nachweisbare basale Expression der c-fos-mRNA im Rückenmark von Sham-behandelten Kontrolltieren. Intraperitoneal applizierte Essigsäure induziert signifikant erhöhte c-fos-mRNA-Spiegel im Rückenmark und bestätigt damit den im Writhing-Test sichtbaren viszeralen Schmerz auch auf Rückenmarksebene. Das radikale O_3/O_2 -Gasgemisch erhöht die c-fos-Expression im Trend, die Steigerung ist aber im Vergleich zur Sham-Kontrolle nicht signifikant erhöht. Eine Aktivierung nervaler Afferenzen aus dem Bauchraum muss daher angenommen werden. Unter Berücksichtigung der Daten aus dem Writhing-Test scheint deren Aktivierungsstärke aber nicht ausreichend stark zu sein, um schmerzassoziierte Verhaltensmuster auszulösen.

Das O_3/O_2 -Pneumoperitoneum führt zwar zur Aktivierung nervaler Afferenzen aus dem Bauchraum, jedoch nicht zu einer bewussten Schmerzwahrnehmung. Seine Anwendung in der Medizin erscheint daher wenig kritisch. Eine schmerzauslösende Komponente von Oxidationsprodukten, die mit Sicherheit durch das stark oxidative Ozon im Bauchraum entstehen, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Die Frage, in wieweit die im Peritoneum entstandenen *radical oxygen species*

(ROS) Einfluss auf das Immunsystem nehmen können, ist die zweite zentrale Frage, die hier beantwortet werden sollte.

4.4 Wirkung von Ozon im Peritoneum auf die Zytokinexpression in der Milz

Aufgrund seiner hohen Reaktivität oxidiert Ozon eine unüberschaubare Menge an biologischen Substanzen und erzeugt damit ein Mix an oxidierten Produkten, den *radical oxygen species* (ROS). ROS können direkt zur Schädigung und Mutation von DNA führen, sie können zusätzlich die für die DNA-Reparatur zuständigen Enzymsysteme zerstören sowie zum Absterben der Zelle führen (Roberts et al., 2010). Physiologisch werden ROS innerhalb der mitochondrialen Atmungskette unter Verbrauch von O₂ gebildet und dienen dem Ausgleich des intrazellulären Redox-Potenzials. Während Entzündungsprozessen kommt es durch einen gesteigerten Zellmetabolismus zur erhöhten ROS-Produktion in der mitochondrialen Atmungskette (Turrens, 2003; Liu et al., 2002). Diese hochreaktiven Moleküle aktivieren durch die oxidative Degradation von Lipiden den Eikosanoid-Stoffwechsel. Es kommt zur vermehrten Produktion von Arachidonsäure-Produkten und so zu einer Stimulation der Zellproliferation und zur Synthese und Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen, die ihrerseits Einfluss auf den Status und die Reaktivität des Immunsystems nehmen können. In der Regel wird hierdurch die Entstehung von Entzündungsprozessen begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich kein signifikanter Effekt auf die Transkription der mRNAs von IL-1 β und IL-6. Weder die O₃/O₂-Insufflation noch das Einbringen einer Essigsäurelösung in den Bauchraum der Maus hatte eine nachweisbare Wirkung auf die Expressionsrate dieser Zytokine. Dies war unerwartet, da es bei Kontakt von Leukozyten mit Ozon, wie es bei der Methode der extrakorporalen Blutozonisierung gegeben ist, zu

einem Anstieg verschiedener Zytokine (TNF- α , GM-CSF, IL-2 sowie IFN- γ) (Bocci et al., 2009) kommt. Allerdings kommt es im Unterschied zur extrakorporalen Methode bei der intraperitonealen Insufflation eines O₃/O₂-Gasgemischs in den Organismus nicht zum direkten Ozon-Leukozyten-Kontakt und auch die unterschiedlichen Milieus von Peritoneal- und Blutzellen müssen hier in Betracht gezogen werden. Ein direkter Kontakt von Leukozyten als auslösendes Moment einer Zellstimulation darf aber unter Berücksichtigung der bakteriziden, viruziden und fungiziden Eigenschaften von Ozon (Zoutman et al., 2011; Martinez-Sanchez et al., 2005) und den zelltoxischen Effekten bei Inhalation in die Lunge als eher unwahrscheinlich gelten. Eher wahrscheinlich ist, dass der Zeitraum nach Beginn der Insufflation und der Analyse der Zytokinexpression von nur 2 h als zu kurz für eine sichtbare Expressionssteigerung proinflammatorischer Zytokine war. Experimentell induzierte septische Ereignisse in der Maus, ausgelöst etwa durch die intraperitoneale Gabe von LPS, sind erst 3 h nach Injektion ausgeprägt sichtbar (Bette et al., 1993).

Die zunehmende Zahl an Publikationen, die einen Einfluss von Ozon auf eine ganze Reihe von Zellepopulationen, insbesondere hämatopoetischer Herkunft beschreiben und die Erkenntnisse der immunbasierten therapeutischen Wirkung des O₃/O₂-PPs auf eine Tumorerkrankung, sprechen ebenfalls dafür, dass der in der vorgelegten Arbeit gewählte Zeitraum nach Stimulation zu kurz war.

Diese Annahme wird weiterhin dadurch unterstützt, dass weitere medizinische, für ein PP verwendeten Gase wie Stickstoffmonoxyd (N₂O), Argon (Ar), Helium (He) und vor allem Kohlenstoffdioxid (CO₂) Effekte am peritonealen Immunsystem aufweisen. Dies liegt unter anderem daran, dass durch das PP allgemein die Integrität des Peritoneums gestört wird. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass peritoneale Mesothelzellen während der Anlage eines Pneumoperitoneums anschwellen und die darunter liegende Basallamina hervortritt. Dadurch kommt es zum

Einwandern von Peritonealmakrophagen und Lymphozyten in die Basallamina. Hierbei sind aber auch die Wahl des insufflierten Gases, der Druckgradient und die Zeitdauer des Pneumoperitoneums von Bedeutung (Suematsu et al., 2001).

Auch werden für jedes Gas spezifische Effekte auf Immunparameter und spezifische Eigenschaften hinsichtlich des tumortherapeutischen Nutzens beobachtet. So konnte durch die Insufflation von CO₂-Gas eine verminderte Produktion von IL-1 und später auch eine verminderte Produktion von TNF- α in Makrophagen nachgewiesen werden (West et al., 1997, Mathew et al., 1999). Im Rahmen der laparoskopischen Tumorchirurgie wurde festgestellt, dass die Wahl des insufflierten Gases Auswirkungen auf die Entwicklung von Port-site-Metastasen (Tumormetastasen an Trokareinstichstellen) hat. Am Rattenmodell wurden die Gase O₂, CO₂, He und N₂O miteinander verglichen. Im Vergleich zu O₂, CO₂ und N₂O kam es unter der Insufflation mit He während laparoskopischer Tumorlaserationen zur signifikant geringeren Ausbildung von Port-site-Metastasen. In Zusammenhang mit der Insufflation von CO₂ wird der tumorigene Effekt auf die Suppression immunkompetenter peritonealer Zellen durch den erhöhten intraabdominellen Druck und die Entstehung einer Azidose auf der peritonealen Oberfläche zurückgeführt (Neuhaus et al., 1998).

4.5 Ausblick: Ozontherapie und Schulmedizin – ein no-go?

Ozon wird aufgrund seiner hohen Reaktivität und seiner chemischen Eigenschaften in vielen Bereichen des Alltags, wie beispielsweise bei der Pflanzenaufzucht in Gewächshäusern, der Wasseraufbereitung, in der Verpackungs- oder Getränkeindustrie oder in der Kosmetikindustrie verwendet. Bei seiner Verwendung im homöopathischen oder

zahnmedizinischen Bereich stehen vor allem seine viru- fungi- oder bakteriziden Eigenschaften im Vordergrund.

Eine Etablierung des Gases als Therapeutikum der Humanmedizin ist bis dato nicht erfolgt. Dies beruht nicht zuletzt auf der Toxizität von Ozon. In erster Linie ist dieser Sachverhalt auf die aktuell dünne wissenschaftliche Datenlage zurückzuführen. Weitere Gründe könnten einerseits das Fehlen einer Therapiestandardisierung, andererseits aber auch die fehlerhafte und unkontrollierte Anwendung von Ozon im Randbereich des medizinischen Arbeitens sein (Bocci et al., 2006).

Im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung beim Menschen, ggf. im Rahmen einer antitumorigenen Therapie, wird es weitere Untersuchungen verlangen: Welche Materialien sind für eine intraperitoneale Insufflationstherapie geeignet? Welche Dosis ist die richtige?

Es wäre falsch, einem Gas von solch enormer Reaktionsfreudigkeit und solch großem chemischen und biologischen Potenzial keine Beachtung zu schenken. Heutzutage hat man die Möglichkeit, mit modernen Verbundstoffen, dem destruktiven Verhalten und der Toxizität von Ozon entgegenzuwirken und dadurch ein Maximum an Sicherheit für Patienten, Therapeuten und Wissenschaftler zu gewährleisten. Es bleibt zu hoffen, dass weitere Studien über das Gas Ozon folgen, um die vorliegenden Ergebnisse zu vergleichen, Vorurteile abzubauen und weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften von Ozon, ggf. im Hinblick auf eine Verwendung als Therapeutikum in der Humanmedizin, zu gewinnen.

5. Zusammenfassung

Ozon (O_3) ist ein metastabiles Gas, welches unter Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen zerfällt. Durch sein großes Oxidationsvermögen und seine antiseptische Wirkung wird es als Therapeutikum in der Humanmedizin häufig extrakorporal verwendet. Über die schmerzinduzierenden und immunmodulatorischen Effekte von O_3 im Rahmen einer intrakorporalen Anwendung ist derzeit noch wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, den Schmerzaspekt einer intraperitonealen Insufflation eines radikalen O_3/O_2 -Gasgemischs zu untersuchen. Ein weiteres Ziel stellte die Sammlung von Anhaltspunkten der Ozonwirkung auf das Immunsystem dar.

Im ersten Teil der Arbeit führten wir zur Detektion und Charakterisierung einer möglichen Schmerzbelastung unter intraperitonealer O_3/O_2 -Insufflationstherapie einen Writhing-Verhaltensversuch durch. Es erfolgte der Verhaltensvergleich von C-57BL/6-Mäusen nach intraperitonealer Insufflation eines O_3/O_2 -Gasgemisches mit Mäusen nach intraperitonealer Applikation von reinem Sauerstoff (100%-iges O_2), von Essigsäure (7 %-ige $H_3C-COOH$, Positivkontrolle) oder 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Sham).

Nach Durchführung des Writhing-Tests wurden die Versuchstiere dekapitiert und Gewebeproben (u.a. Rückenmark und Milz) entnommen.

Im zweiten Teil erfolgte die weitere Analyse einer möglichen Schmerzkomponente unter O_3/O_2 -Pneumoperitoneum durch Messung der c-fos-Genexpression im thorakolumbalen Rückenmark mittels Realtime-PCR (qPCR). Des Weiteren wurde die Ozonwirkung auf das Immunsystem untersucht. Hierzu wurde die Veränderung der Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β im sekundär Lymphatischen Milzgewebe der Maus durch eine weitere qPCR ermittelt.

Das Ergebnis des Writhing-Verhaltensversuchs schließt die Entstehung von viszeralem Schmerz durch die intraperitoneale O₃/O₂-Insufflation aus. Mögliche Dehnungsartefakte konnten durch die Insufflation von inertem O₂ und die dabei ausgebliebene Writhing-Antwort ebenfalls ausgeschlossen werden.

Eine deutlich erhöht gemessene c-fos-Genexpression im Rückenmark deutet auf eine Schmerzwahrnehmung nach O₃/O₂-Insufflation, trotz reduzierter Writhing-Aktionen hin.

Aus den Daten der qPCR kann geschlossen werden, dass weder die intraperitoneale H₃C-COOH-Injektion noch die O₃/O₂-Gasinsufflation immunstimulative Wirkungen aufweisen.

Dies bedeutet, dass eine therapeutische Anwendung eines O₃/O₂-Pneumoperitoneums nur unter adäquater Analgesie erfolgen sollte. Eine pathologische Immunstimulation durch die intraperitoneale O₃/O₂-Insufflation hingegen ist nicht zu erwarten.

6. Summary

Ozone (O_3) is a metastable gas, which disaggregates with the formation of reactive oxygen combinations. Due to its powerful oxidation ability and antiseptic qualities, it is often used in human medicine as an additional therapeutic agent externally. Little is currently known about the pain and immunomodulatory effects of intraperitoneally applied O_3 .

One aim of this study was the investigation of the pain aspect of intraperitoneal insufflation of a O_3/O_2 -gas mixture. A further aim was the collection of evidence of ozone-effects on the immune system.

For the detection and characterization of a possible burden of pain among intraperitoneal O_3/O_2 -insufflation-therapy we initially performed a writhing response test. The behavior of C-57BL/6-mice, following intraperitoneal insufflation of a O_3/O_2 -gas mixture, was compared with that of mice following intraperitoneal administration of pure oxygen (100% pure O_2), acetic acid (7% $H_3C-COOH$, positive control) or 0.9% NaCl solution (Sham).

After the writhing test, the mice were decapitated and tissue samples were taken (including spinal cord and spleen).

As a second step, an analysis was made of a possible pain component of O_3/O_2 -pneumoperitoneum whereby the c-fos-gene-expression in the thoracolumbar spinal cord was measured, using real-time PCR (qPCR).

Furthermore, the effects of ozone on the immune system were investigated. For this purpose, the change of gene expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β in the secondary lymphatic mouse spleen tissue was determined by performing another qPCR.

The result of the writhing behavior experiment precludes the occurrence of visceral pain during intraperitoneal O_3/O_2 -insufflation. By insufflation of inert O_2 -gas there was no sign of writhing responses, therefore stretching artifacts could be excluded. Measurement of significantly increased

c-fos-gene-expression in the spinal cord suggested a perception of pain after O₃/O₂-insufflation, despite reduced writhing actions during the writhing behavior experiment.

From qPCR-data it is concluded that neither the H₃C-COOH-intraperitoneal-injection nor the insufflation of O₃/O₂-gas-mixture provide immunostimulative effects.

This means that a therapeutic application of O₃/O₂ gas mixture should only be performed under adequate analgesia. A pathological immune stimulation caused by intraperitoneal O₃/O₂ insufflation however, is not to be expected.

7. Quellennachweis

1. Abrahm, J., E. Ross, et al. (2009). Cancer-related visceral pain. Bonica's Management of Pain. S. M. Fishman, J. C. Ballantyne and J. P. Rathmell, Lippincott Williams & Wilkins: 635-643.
2. Amiot, F., C. Fitting, et al. (1997). "Lipopolysaccharide-induced cytokine cascade and lethality in LT alpha/TNF alpha-deficient mice." Mol Med **3**(12): 864-75.
3. Arya, M., I. S. Shergill, et al. (2005). "Basic principles of real-time quantitative PCR." Expert Rev Mol Diagn **5**(2): 209-19.
4. Babior, B. M., C. Takeuchi, et al. (2003). "Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3031-4.
5. Basbaum, A. I. (1999). "Spinal mechanisms of acute and persistent pain." Reg Anesth Pain Med **24**(1): 59-67.
6. Becker, S., M. C. Madden, et al. (1991a). "Modulation of human alveolar macrophage properties by ozone exposure in vitro." Toxicol Appl Pharmacol **110**(3): 403-15.
7. Becker, S., J. Quay, et al. (1991b). "Effect of ozone on immunoglobulin production by human B cells in vitro." J Toxicol Environ Health **34**(3): 353-66.
8. Bette, M., M. K. Schafer, et al. (1993). "Distribution and kinetics of superantigen-induced cytokine gene expression in mouse spleen." J Exp Med **178**(5): 1531-9.
9. Bocci, V., E. Borrelli, et al. (2009). "The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug." Med Res Rev **29**(4): 646-82.
10. Bocci, V. und N. Di Paolo (2009). "Oxygen-ozone therapy in medicine: an update." Blood Purif **28**(4): 373-6.
11. Bonica, J. J. (1979). "The need of a taxonomy." Pain **6**(3): 247-8.
12. Borghetti, P., R. Saleri, et al. (2009). "Infection, immunity and the neuroendocrine response." Vet Immunol Immunopathol **130**(3-4): 141-62.
13. Burleson, G. R., L. L. Keyes, et al. (1989). "Immunosuppression of pulmonary natural killer activity by exposure to ozone." Immunopharmacol Immunotoxicol **11**(4): 715-35.

-
14. Calvino, B. und R. M. Grilo (2006). "Central pain control." Joint Bone Spine **73**(1): 10-6.
 15. Cervero, F. und J. M. Laird (1999). "Visceral pain." Lancet **353**(9170): 2145-8.
 16. Cesare, P. und P. McNaughton (1997). "Peripheral pain mechanisms." Curr Opin Neurobiol **7**(4): 493-9.
 17. Chapman, S. (1930). "A Theory of Upper-Atmospheric Ozone." Memoires of the Royal Meteorological Society **3**: 103-125.
 18. Chekan, E. G., C. Nataraj, et al. (1999). "Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum." Surg Endosc **13**(11): 1135-8.
 19. Chen, X., S. H. Gavett, et al. (1995). "CD4+ T lymphocyte modulation of ozone-induced murine pulmonary inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(4): 396-403.
 20. Coggeshall, R. E. (2005). "Fos, nociception and the dorsal horn." Prog Neurobiol **77**(5): 299-352.
 21. Corwin, E. J. (2000). "Understanding Cytokines Part I: Physiology and Mechanism of Action." Biol Res Nurs **2**(30): 30-40.
 22. Crutzen, P. J., I. S. Isaksen, et al. (1975). "Solar proton events: stratospheric sources of nitric oxide." Science **189**(4201): 457-9.
 23. DeLorme, M. P., H. Yang, et al. (2002). "Hyperresponsive airways correlate with lung tissue inflammatory cell changes in ozone-exposed rats." J Toxicol Environ Health A **65**(19): 1453-70.
 24. Dinarello, C. A. (1999). "Cytokines as endogenous pyrogens." J Infect Dis **179 Suppl 2**: S294-304.
 25. Dobson, G. M. B. (1924). "Apparatus for measuring ophotographic densities." Nature **113**: 494-495.
 26. Dobson, G. M. B. und D. N. Harrison (1925). "Measurements of the amount of ozone in the upper atmosphere." Quart. J. R. Met. Soc. **51**: 363-369.
 27. Dunne, A. A., R. Mandic, et al. (2002). "Lymphogenic metastatic spread of auricular VX2 carcinoma in New Zealand white rabbits." Anticancer Res **22**(6A): 3273-9.
 28. Eckhardt, E. T., F. Cheplovitz, et al. (1958). "Etiology of chemically induced writhing in mouse and rat." Proc Soc Exp Biol Med **98**(1): 186-8.
 29. Egger, G. (2005). Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und

-
30. klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität. Wien, Springer-Verlag.
 31. Elenkov, I. J., D. G. Iezzoni, et al. (2005). "Cytokine dysregulation, inflammation and well-being." Neuroimmunomodulation **12**(5): 255-69.
 32. Erlwein, G. (1902). "Siemens'sche Ozonwasserwerke. Wiesbaden-Schierstein und Paderborn." Zeitschrift für Elektrochemie **8**(48): 881-887.
 33. Fabry, C. und H. Bullson (1913). "L'absorption de l'ultraviolet par l'ozone et la limite du spectre solaire." J. Phys., 5th Ser. **3**: 196-206.
 34. Farman, J. C., B. G. Gardiner, et al. (1985). "Large Losses of Total Ozone Reveal Seasonal ClOx/NOx Interaction." Nature **315**: 207-210.
 35. Fenton, M. J. (1992). "Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression." Int J Immunopharmacol **14**(3): 401-11.
 36. Frimann-Dahl, J. und K. Traetteberg (1962). "Parietography of the stomach." Br J Radiol **35**: 249-54.
 37. Gabay, C. und I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-54.
 38. Garantziotis, S., Z. Li, et al. (2009). "Hyaluronan mediates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice." J Biol Chem **284**(17): 11309-17.
 39. Giamalva, D., D. F. Church, et al. (1985). "A comparison of the rates of ozonation of biological antioxidants and oleate and linoleate esters." Biochem Biophys Res Commun **133**(2): 773-9.
 40. Giamalva, D., D. F. Church, et al. (1986b). "Kinetics of ozonation. 5. Reactions of ozone with carbon-hydrogen bonds." J Am Chem Soc **108**(24): 7678-7681.
 41. Giamalva, D. H., D. F. Church, et al. (1986a). "Kinetics of ozonation. 4. Reactions of ozone with .alpha.-tocopherol and oleate and linoleate esters in carbon tetrachloride and in aqueous micellar solvents." J. Am. Chem. Soc. **108**(21): 6646-6651.
 42. Glaze, W. H. (1986). "Reaction products of ozone: a review." Environ Health Perspect **69**: 151-7.
 43. Gray, H. (2005). Gray's Anatomy. London, UK, Elsevier, Churchill Livingstone.
 44. Grundy, D. (2002). "Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent." Gut **51 Suppl 1**: i2-5.

-
45. Gurusamy, K. S., K. Samraj, et al. (2009). "Low pressure versus standard pressure pneumoperitoneum in laparoscopic cholecystectomy." Cochrane Database Syst Rev (2): CD006930.
 46. Halliwell, B. und J. M. C. Gutteridge (1999). Free radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press (Oxford and New York).
 47. Hartley, W. N. (1881). "On the Absorption Spectrum of Ozone, and the Absorption of Solar Rays by Atmospheric Ozone." Journ. Chem. Soc. **39**: 57, 111, 119.
 48. Hernuss, P., E. Muller-Tyl, et al. (1974). "[Radiosensitizing effect of ozone in animal experiment]." Strahlentherapie **147**(1): 91-6.
 49. Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
 50. Hobson, A. R. und Q. Aziz (2003). "Central nervous system processing of human visceral pain in health and disease." News Physiol Sci **18**: 109-14.
 51. Hoffman, G. E. und D. Lyo (2002). "Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'?" J Neuroendocrinol **14**(4): 259-68.
 52. Hollingsworth, J. W., S. Maruoka, et al. (2007). "Ambient ozone primes pulmonary innate immunity in mice." J Immunol **179**(7): 4367-75.
 53. Hooker, M. H. und B. G. Gazzard (1992). "Ozone-treated blood in the treatment of HIV infection." Aids **6**(1): 131.
 54. Hossaini, M., L. S. Duraku, et al. "Differential distribution of activated spinal neurons containing glycine and/or GABA and expressing c-fos in acute and chronic pain models." Pain **151**(2): 356-65.
 55. Houzeau, A. (1856). "Recherches sur l'oxygène à l'état naissant." C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C **43**: 34-38.
 56. Hunt, S. P. und B. Hervé (2005). The ascending pain pathways. The Neurobiology of Pain. S. P. Hunt and K. M., Oxford University Press: 166-172.
 57. Ishii, Y., H. Yang, et al. (1997). "Rat alveolar macrophage cytokine production and regulation of neutrophil recruitment following acute ozone exposure." Toxicol Appl Pharmacol **147**(2): 214-23.

-
58. Jacobi, C. A., F. Wenger, et al. (1998). "The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model." Dig Surg **15**(2): 110-6.
 59. Janic, B., T. M. Umstead, et al. (2005). "Modulatory effects of ozone on THP-1 cells in response to SP-A stimulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(2): L317-25.
 60. Jerrett, M., R. T. Burnett, et al. (2009). "Long-term ozone exposure and mortality." N Engl J Med **360**(11): 1085-95.
 61. Koto, H., M. Salmon, et al. (1997). "Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in ozone-induced airway inflammation and hyperresponsiveness." Am J Respir Crit Care Med **156**(1): 234-9.
 62. Langford, D. J., S. E. Crager, et al. (2006). "Social modulation of pain as evidence for empathy in mice." Science **312**(5782): 1967-70.
 63. Larini, A. und V. Bocci (2005). "Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells." Toxicol In Vitro **19**(1): 55-61.
 64. Last, J. A., D. L. Warren, et al. (1987). "Modification by ozone of lung tumor development in mice." J Natl Cancer Inst **78**(1): 149-54.
 65. Le Bars, D., M. Gozariu, et al. (2001). "Animal models of nociception." Pharmacol Rev **53**(4): 597-652.
 66. Le Bars, D., M. Gozariu, et al. (2001a). "Animal models of nociception." Pharmacol Rev **53**(4): 597-652.
 67. Le Bars, D., M. Gozariu, et al. (2001b). "[Acute pain measurement in animals. Part 1]." Ann Fr Anesth Reanim **20**(4): 347-65.
 68. Li, Y., A. Ji, et al. (2004). "Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion." J Neurosci **24**(43): 9623-31.
 69. Li, Z., R. M. Tighe, et al. (2013). "Genes of innate immunity and the biological response to inhaled ozone." J Biochem Mol Toxicol **27**(1): 3-16.
 70. Liu, Y., G. Fiskum, et al. (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." J Neurochem **80**(5): 780-7.
 71. Mandic, R., A. A. Dunne, et al. (2002). "Expression of MMP-3, MMP-13, TIMP-2 and TIMP-3 in the VX2 carcinoma of the New Zealand white rabbit." Anticancer Res **22**(6A): 3281-4.
 72. Martinez-Sanchez, G., S. M. Al-Dalain, et al. (2005). "Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot." Eur J Pharmacol **523**(1-3): 151-61.

73. Marum, M. v. (1785). "Beschryving eener ongemeen groote electrizeer-machine, geplaatst In Teyler's Museum te Haarlem, en van de Proefneemingen met dezelve in 't werk gesteld = Description d'une très grande machine électrique, placée dans le Muséum de Teyler a Haarlem, et des expériences faits par le moyen de cette machine." Verhandelingen uitgegeven door Teylers tweede Genootschap **3**: 169-176.
74. Mathew, G., D. I. Watson, et al. (1999). "The role of peritoneal immunity and the tumour-bearing state on the development of wound and peritoneal metastases after laparoscopy." Aust N Z J Surg **69**(1): 14-8.
75. Menes, T. und H. Spivak (2000). "Laparoscopy - Searching for the proper insufflation gas." Surg Endosc **14**: 1050-1056.
76. Mogil, J. S., S. G. Wilson, et al. (1999). "Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception." Pain **80**(1-2): 67-82.
77. Molina, M. J. und F. S. Rowland (1974). "Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone." Nature **249**: 810-812.
78. Müller, L., L. E. Brighton, et al. (2013). "Ozone exposed epithelial cells modify cocultured natural killer cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **304**(5): L332-41.
79. Ness, T. J. (1999). "Models of Visceral Nociception." Ilar J **40**(3): 119-128.
80. Neuhaus, S. J., T. Ellis, et al. (1998). "Tumor implantation following laparoscopy using different insufflation gases." Surg Endosc **12**(11): 1300-2.
81. Park, J. W., C. Taube, et al. (2004). "Complement activation is critical to airway hyperresponsiveness after acute ozone exposure." Am J Respir Crit Care Med **169**(6): 726-32.
82. Pichavant, M., S. Goya, et al. (2008). "Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17." J Exp Med **205**(2): 385-93.
83. Pryor, W. A. (1986). "Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions." Annu Rev Physiol **48**: 657-67.
84. Pryor, W. A. (1992). "How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts?" Free Radic Biol Med **12**(1): 83-8.

85. Pryor, W. A., K. N. Houk, et al. (2006). "Free radical biology and medicine: it's a gas, man!" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **291**(3): R491-511.
86. Purves, D., G. J. Augustine, et al. (2001). Central Pain Pathways: The Spinothalamic Tract. Neuroscience. Sunderland (MA), Sinauer Associates Inc.
87. Rahman, I., S. K. Biswas, et al. (2006). "Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases." Eur J Pharmacol **533**(1-3): 222-39.
88. Raja, S. N., R. A. Meyer, et al. (1988). "Peripheral mechanisms of somatic pain." Anesthesiology **68**(4): 571-90.
89. Roberts, R. A., R. A. Smith, et al. (2010). "Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species." Toxicology **276**(2): 85-94.
90. Rodriguez, Z. Z., D. Guanche, et al. "Effects of ozone oxidative preconditioning on different hepatic biomarkers of oxidative stress in endotoxic shock in mice." Toxicol Mech Methods **21**(3): 236-40.
91. Ruidavets, J. B., M. Cournot, et al. (2005). "Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction." Circulation **111**(5): 563-9.
92. Sapundzhiev, N., A. A. Dunne, et al. (2005). "The auricular VX2 carcinoma: feasibility of complete tumor resection." Anticancer Res **25**(6B): 4209-14.
93. Schönbein, C. F. (1840). "Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chimiques." Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences **10**: 706-710.
94. Schulz, S. (1986). "The role of ozone/oxygen in clindamycin-associated enterocolitis in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*)."
Lab Anim **20**(1): 41-8.
95. Schulz, S. (1989). Anticarcinogenic effect of inhaled ozone/oxygene in urethan-treated NMRI-mice. Proceedings of the Ninth Ozone World Congress, New York.
96. Schulz, S., U. Haussler, et al. (2008). "Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas." Int J Cancer **122**(10): 2360-7.
97. Schulz, S., Z. Z. Rodriguez, et al. (2003). "Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats." Eur Surg Res **35**(1): 26-34.

-
98. Sengupta, J. N. (2009). "Visceral pain: the neurophysiological mechanism." Handb Exp Pharmacol(194): 31-74.
 99. Siegmund, E., R. Cadmus, et al. (1957). "A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics." Proc Soc Exp Biol Med **95**(4): 729-31.
 100. Soret, J. L. (1864). "Ueber die elektrolytische Darstellung des Ozons und über die Natur dieses Körpers." Annalen der Physik **194**(4): 623-629.
 101. Steinhart, H., S. Schulz, et al. (1999). "Evaluation of ozonated oxygen in an experimental animal model of osteomyelitis as a further treatment option for skull-base osteomyelitis." Eur Arch Otorhinolaryngol **256**(3): 153-7.
 102. Steppan, J., T. Meaders, et al. (2010). "A metaanalysis of the effectiveness and safety of ozone treatments for herniated lumbar discs." J Vasc Interv Radiol **21**(4): 534-48.
 103. Stoker, G. M. R. C. P. I., M.R.C.S. ENG, MAJOR, ROYAL ARMY MEDICAL CORPS (1916). "The surgical use of ozone." The Lancet **188**(4680): 712.
 104. Suematsu, T., Y. Hirabayashi, et al. (2001). "Morphology of the murine peritoneum after pneumoperitoneum vs laparotomy." Surg Endosc **15**(9): 954-8.
 105. Suffredini, A. F., G. Fantuzzi, et al. (1999). "New insights into the biology of the acute phase response." J Clin Immunol **19**(4): 203-14.
 106. Sweet, F., M. S. Kao, et al. (1980). "Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells." Science **209**(4459): 931-3.
 107. Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-44.
 108. UNEP (2009). Handbook for the Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. United Nations Environment Programme, Nairobi, Secretariat for The Vienna Convention for the Protection of the Ozone Layer & The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer.
 109. Uysal, N. und R. M. Schapira (2003). "Effects of ozone on lung function and lung diseases." Curr Opin Pulm Med **9**(2): 144-50.
 110. Van Loveren, H., E. I. Krajnc, et al. (1990). "Effects of ozone, hexachlorobenzene, and bis(tri-n-butyltin)oxide on natural killer activity in the rat lung." Toxicol Appl Pharmacol **102**(1): 21-33.

111. Wagner, J. G., S. J. Van Dyken, et al. (2003). "Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways." Toxicol Sci **74**(2): 437-46.
112. Watkins, L. R. und S. F. Maier (1999). "Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7710-3.
113. Wentworth, P., Jr., J. E. McDunn, et al. (2002). "Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation." Science **298**(5601): 2195-9.
114. West, M. A., D. J. Hackam, et al. (1997). "Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide: relevance to laparoscopic surgery." Ann Surg **226**(2): 179-90.
115. Westlund, K. N. (2000). "Visceral nociception." Curr Rev Pain **4**(6): 478-87.
116. Willis, W. D., E. D. Al-Chaer, et al. (1999). "A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7675-9.
117. Zoutman, D., M. Shannon, et al. (2011). "Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces." Am J Infect Control **39**(10): 873-9.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gliederung der Schmerzempfindung.....	9
Abbildung 2: Verlauf der Schmerzbahn	12
Abbildung 3: Lokalisation und Verlauf der primären Schmerzafferenzen.....	14
Abbildung 4: Versuchsbox für den Writhing-Test.....	22
Abbildung 5: Ozongenerator „Medozon compact“.....	24
Abbildung 6: Datenprotokoll zur Quantifizierung der Writhing-Aktionen.....	26
Abbildung 7: Writhing-Aktionen im Vergleich zum normalen Verhalten	42
Abbildung 8: Writhing-Test.....	44
Abbildung 9: RNA-Analyse mit dem Experion-Mikroelektrophorese-System	47
Abbildung 10: qPCR von c-fos.....	48
Abbildung 11: qPCR von β -Aktin	50
Abbildung 12: Regulation der c-fos-Expression berechnet nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	51
Abbildung 13: Regulation der c-fos-Expression basierend auf einer absoluten Quantifizierung der Templates	52
Abbildung 14: Änderungen der Expressionsspiegel von IL-1 β - und IL-6- mRNA berechnet nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.....	55
Abbildung 15: Regulation der IL-1 β - und IL-6-mRNA basierend auf einer absoluten Quantifizierung der Templates	54

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlungsschema für den Writhing-Test	24
Tabelle 2: Schema zur Organpräparation nach dem Writhing-Test	27
Tabelle 3: Schema für die Reverse Transkription	33
Tabelle 4: Ansatz für einen PCR-Mastermix	36
Tabelle 5: 2 unabhängige Verdünnungsreihen	38
Tabelle 6: Für die qPCR verwendete Primerpaare	39
Tabelle 7: Verwendete Volumina für den qPCR-Mastermix	40
Tabelle 8: Repräsentative Belegung einer 96-Well-Platte für die qPCR	40
Tabelle 9: Statistische Auswertung der Writhing-Aktionen.....	45
Tabelle 10: Sensitivität, Korrelationsfaktor, Primereffizienz der Standardkurve für IL-1 β und IL-6	54
Tabelle 11: p-Werte für den Vergleich der Behandlungsgruppen für die IL-1 β - und IL-6-Templates	56

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ar	Argon
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C	Kohlenstoffatom
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CT-Wert	Cycle Threshold
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dez.	Dezember
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
etc.	et cetera
g	Gramm
G	Gauge (Kanülenaussendurchmesser)
G	Guanin
h	Stunde
H	Wasserstoffatom
H ₂ O	Wasser
H ₃ C-COOH	Essigsäure
i.d.R.	in der Regel
IL	Interleukin
IPK	Interplate-Kalibrator
l	Liter
mM	Millimolar
min	Minute
mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
N.	Nervus
Nn	Nervi
NTC	non-target-control
N-Terminus	Aminotermius
Nr.	Nummer
O	Sauerstoffatom
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pH	potentia Hydrogenii
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygene species
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real-time-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	standard error of the mean
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
U	Urapidil
u.a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Xe	Xenon
xg	x-Faches der mittleren Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

8.4 Vielfache und Fraktionen

G	Giga	10^9
M	Mega	10^8
K	Kilo	10^6
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
P	Pico	10^{-12}

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bette, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, del Rey, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fritz, Garn, Garten, Geks, Gerdes, Gress, Grzeschik, Hasilik, Hofmann, Kalinowski, Kann, Klenk, Klose, Koolmann, Koop, Krieg, Kroll, Leonhardt, Lill, Liß, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Meißner, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Mühlberger, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Quante, Ramaswamy, Reese, Renz, Roeper, Röhm, Rogosch, Rominger, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schuh, Schwarz, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Steiniger, Straßmann, Stempel, Suske, Tackenberg, Tebbe, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Westhoff, Wulf, Zemlin, Zwioerek.

8.6 Danksagung

Herzlichen Dank meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Bette für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung bei der Durchführung und Vollendung dieser Arbeit.

Vielen Dank Herrn Prof. Dr. med. Eberhard Weihe für die Bereitstellung des Labors und aller technischen Geräte.

Ein herzliches Dankeschön an die TAs der Abteilung molekulare Neurowissenschaften! Ohne Euch ginge nichts!!! Heidi, Annette, Marion, Barbara, Heike, Michael Ihr seid großartig!

Ein spezielles Dankeschön an Frau Lattermann, nicht nur für das Anfertigen von tausenden von Gewebeschnitten, sondern auch für das kostenlose Entertainment!

Dr. rer. nat. Silke Müller danke ich für die ausdauernde Unterstützung bei der Tierpräparation.

Dr. rer. nat. Eva Heller und MASc Katja Siewering sage ich „Vielen, vielen Dank“ für die vielen Tipps und Tricks für die qPCR.

Dr. rer. nat. Kerstin Klook werde ich die Einführung in die Laborarbeit und die Starthilfe für meine Dissertation nicht vergessen.

Meiner Freundin Maren möchte ich für ihre große Geduld danken, die während dieser Arbeit nicht nur einmal auf die Probe gestellt wurde. Danke für Deine Unterstützung, Deine unentwegte Aufmunterung und den Halt, den Du mir gibst.

Zuletzt möchte ich den beiden Menschen danken, die mir all das ermöglicht haben und die mich durch ihre unentwegte Unterstützung, ihre harte Arbeit, ihre Erziehung und ihre Liebe zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern Brigitte und Bruno, meinen Finanziers, meinen Unterstützern in jeder Lebenslage, meinen beiden größten Fans.